

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. Matthias Graw

**Grundlagenforschung zur Diagnostik  
von Verletzungen an Strukturen der  
Halswirbelsäule nach simuliertem  
Heckaufprall im Tiermodell**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

An der medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von

Nathalie Gales

Saarbrücken 2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Matthias Graw
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Ortrud Steinlein PD Dr. med. Christof Birkenmaier
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Sylvia Schick
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	01.04.2015

**„Der Mensch erkennt, daß es nichts nützt,  
Wenn er den Geist an sich besitzt,  
Weil Geist uns dann erst Freude macht,  
Sobald er zu Papier gebracht.“**

Eugen Roth

***Meiner Mutter gewidmet –  
In liebevoller Erinnerung***

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>9</b>
 <b>1. Einleitung .....</b>	 <b>10</b>
 <b>2. Theoretische Grundlagen .....</b>	 <b>12</b>
2.1 Biomechanik und forensische Traumatologie .....	12
2.2 Die HWS-Distorsion .....	13
2.2.1 Begriffe und Definition .....	13
2.2.2 Der Bewegungsablauf beim Heckaufprall .....	14
2.2.3 Verletzungsklassifikationen .....	17
2.3 Die zervikale Wirbelsäule .....	18
2.3.1 Anatomie der HWS und angrenzender Strukturen .....	18
2.3.2 Hypothesen zu Verletzungen im Zervikalbereich .....	22
2.4 Vorstellung des Projektes .....	26
2.5 Fragestellung vorliegender Arbeit .....	29
 <b>3. Material und Methoden .....</b>	 <b>31</b>
3.1 Versuchstiere und ethische Aspekte .....	31
3.2 Der Versuchsaufbau .....	31
3.2.1 Die Versuchsanlage .....	32
3.2.2 Die Messtechnik .....	34
3.3 Versuchsdurchführung .....	36
3.3.1 Die Exposition .....	36
3.3.2 Anästhesie, operative Vorbereitung und Überwachung ....	38
3.4 Probenentnahme- und aufbereitung .....	40
3.4.1 Blutproben .....	40
3.4.2 Muskelproben .....	41
3.4.3 Facettengelenksproben .....	43
3.5 Histologische Untersuchungen – Muskulatur .....	45
3.5.1 Fixierung und Einbettung .....	45
3.5.2 Schnittanfertigung .....	45
3.5.3 Färbungen .....	46
3.6 Histologische Untersuchungen – Facettengelenke .....	49
3.6.1 Demineralisierung .....	49
3.6.2 Einbettung .....	50
3.6.3 Schnittanfertigung .....	50

3.6.4	Histologische Färbungen .....	51
3.6.5	Bildgebende Verfahren .....	51
3.7	Datenerhebung und Befundung .....	54
3.7.1	Datenerhebung der Serumproben .....	54
3.7.2	Histologische Datenerhebung .....	55
3.7.3.	Datenanalyse und Darstellung der Ergebnisse .....	58
3.7.4	Bildgebung .....	61
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>62</b>
4.1	Serumanalyse .....	63
4.1.1	Myoglobin.....	63
4.1.2	CK-MM.....	63
4.2	Histologische Analysen .....	65
4.2.1	Zervikale Muskulatur .....	65
4.2.2	Zervikale Facettengelenke .....	78
4.3	Bildgebung und Histologie der zervikalen Muskulatur .....	84
4.3.1	Magnetresonanztomographie – pre-mortale Aufnahmen der zervikalen Muskulatur vor und nach Traumasetzung .....	84
4.4	Bildgebung der Facettengelenke .....	89
4.4.1	Phasen-Kontrast-Röntgen.....	89
4.4.2	Vergleich: Phasen-Kontrast-Röntgen und MRT Aufnahmen im Facettengelenk.....	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>92</b>
5.1	Verletzungsdetektion - zervikale Muskulatur .....	92
5.1.1	Serummarker .....	93
5.1.2.	Histologische Auswertung.....	95
5.2.	Verletzungsdetektion - zervikale Facettengelenke	107
5.3	Diskussion Tiermodell.....	109
5.4	Allgemeine Diskussion und Ausblick.....	111
	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>115</b>
	<b>Summary .....</b>	<b>119</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>122</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>132</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>134</b>
A1	Serumanalyse.....	134
A2	MRT-Protokoll.....	143
A3	Muskelpräparation – porcine posteriore zervikale Muskulatur	145

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Einzelne Bewegungsphasen des Kopf-Hals Komplexes von männlichen und weiblichen Probanden bei einem Schlittenversuch (simulierter Heckaufprall) mit Angaben des ungefähren zeitlichen Verlaufs einer jeden Phase der HWS-Stellung. (Hell, 1999).....	16
<b>Abbildung 2</b> Graphische Übersicht der oberflächlichen und tiefen posterioren zervikalen Muskeln im Menschen (Quelle: Atlas der Anatomie des Menschen, Sobotta, Band 2, 21. Auflage, Seite 38) .....	21
<b>Abbildung 3</b> Übersicht der kompletten Aluminium-Testanlage mit Abbildung der Kopfauflegeplatte (A), der Vorrichtung für die Seilwinde und Vorspannung der Latexschläuche (B) sowie der seitlichen Begrenzung für den OP-Tisch (C) .....	32
<b>Abbildung 4</b> Aufsicht der Kopf-Auflageplatte mit einem "Bi-fold" Arm zur freien Bewegung der Platte in Ihrer Sagittalebene .....	33
<b>Abbildung 5</b> Ansicht der Kopf-Auflageplatte von unten, Darstellung der U-Bolzen (Schäkel) für die Befestigung des Freisetzungsmechanismus (A1) sowie der Latexschläuche (A2). .....	33
<b>Abbildung 6</b> komplette Testanlage mit Ansicht auf gespannte Latexschläuche (A) und des Freisetzungsmechanismus (B). .....	34
<b>Abbildung 7</b> Übersicht der einzelnen Messgeräte, die für die Erfassung der Beschleunigungsmessdaten, die Druckmessung im Spinalkanal sowie die Überwachung der applizierten Kraft benutzt wurden. (a = Kraftaufnehmer; b = Bedienelement; c = Steuerimpuls zur Lösung der Arretierung; d = High-Speed Video; e = Datenerfassung) .....	35
<b>Abbildung 8</b> Der Versuchsaufbau – Ansicht von oben .....	37
<b>Abbildung 9</b> Entnahme des rechten M. rhomboideus capitis (1) .....	42
<b>Abbildung 10</b> Links: Übersichtszeichnung zweier Wirbelkörper mit Markierung der Lage eines Facettengelenkes. Rechts: Ansicht eines Facettengelenkes auf Höhe C4/5 rechtsseitig bei Entnahme.....	43
<b>Abbildung 11</b> Ansicht der entkalkten Facettengelenke nach Schnitt in der Transversalebene vor Einbettung .....	50
<b>Abbildung 12</b> Positive Fibronektinreaktion; Nachweis einer vitalen Reaktion durch typische Fibrin-Netzbildung. Übersicht einer vitalen Hautwunde nach zwei Tagen Überlebenszeit (Quelle: Betz et al. 1993; Seite 23, Bild 3)	56
<b>Abbildung 13</b> Prozentuale Änderung der durchschnittlichen CK-MM Enzymaktivitäten der exponierten Tiere und der Negativkontrollen in Bezug zum Ausgangswert (Mittelwert von Ausgangswert 1 und 2) .....	64

<b>Abbildung 14</b> H&E-Schnitt der Artefakt-Ausschlusskontrolle des M. biventer ohne Exposition des Tieres mit sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer starken Ödematisierung des Muskelgewebes, festgestellt durch Weitung des interstitiellen Raumes (Vergrößerung 5 x).....	67
<b>Abbildung 15</b> Berliner-Blau-Färbung einer Muskelprobe des M. splenius im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Fehlender Nachweis einer Hämosiderin Reaktion im Einblutungsbereich (Vergrößerung 10 x).....	68
<b>Abbildung 16</b> Allgemeine Übersicht über die Anzahl der Muskeln mit und ohne Einblutungen .....	70
<b>Abbildung 17</b> H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. obliquus im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Darstellung einer massiven interstitiellen Einblutung und beginnender leukozytärer Infiltration (Stern) (Vergrößerung 10 x) .....	72
<b>Abbildung 18</b> Vorkommen von zellulären Verletzungszeichen in den jeweilig untersuchten Muskeln .....	73
<b>Abbildung 19</b> Vorkommen von strukturellen Verletzungszeichen (Faserrisse /Fasernekrosen) in den jeweilig untersuchten Muskeln.....	74
<b>Abbildung 20</b> Qualitative Betrachtung von Verletzungsvorkommen wie Einblutungen, zelluläre und strukturelle Verletzungen in den jeweilig untersuchten Muskeln .....	75
<b>Abbildung 21</b> H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. longissimus nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer lymphozytären Infiltration (Pfeile) ( Vergrößerung 20 x).....	75
<b>Abbildung 22</b> H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. longissimus nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Nachweis eines Faserriss mit beginnender zellulärer Abräumreaktion (Pfeil) ( Vergrößerung 10 x).....	76
<b>Abbildung 23</b> Fibronektin-Färbung einer Muskelprobe des M. obliquus cranialis im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit ohne eindeutige vitale Reaktion im Einblutungsbereich (Vergrößerung 5 x).....	78
<b>Abbildung 24</b> Anzahl der entnommen Facettengelenke nach deren Entnahmehöhe und Häufigkeit von Einblutungen .....	80

**Abbildung 25** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C2/3 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung im Bereich des Knorpelgewebes, Randbereich des Gelenkes (Pfeil) (Vergrößerung 10 x) (Stern = Gelenkspalt). Darstellung der breiten Knorpelschicht 1 = hyaliner Knorpel; 2= Säulenknorpel und (3) Blasenknorpel ..... 81

**Abbildung 26** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C2/3 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung in das periostale Weichgewebe (Pfeile) (Vergrößerung 10 x) (Stern = Gelenkspalt) ..... 82

**Abbildung 27** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C3/4 rechtsseitig. Nachweis eines intakten Facettengelenkes bei einer Negativkontrolle (Vergrößerung 5 x). Darstellung des subchondralen Knochens (1) des Gelenkknorpels (2) der Gelenkkapsel (3) sowie der Synovialzotten (4) und des Gelenkspaltes (Stern) ..... 82

**Abbildung 28** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C4/5 linksseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung in das Knorpelgewebe und Entzündungsreaktion mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen (Pfeil) (Vergrößerung 20 x) (Stern = Gelenkspalt) ..... 83

**Abbildung 29** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C4/5 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis wie in Abbildung 28, Verletzung des Knorpelgewebes mit Darstellung von Erythrozyten und Entzündungszellen unter 10-facher Vergrößerung (Stern = Gelenkspalt) ..... 84

**Abbildung 30** MR Aufnahmen des Versuchstieres #13 vor Translations-Extensionstrauma (pre-Exposition); Ansicht in der Frontalebene, Schnitt auf Höhe der Spitze des Processus spinosus von C6 (Stern), mit Markierung der zervikalen Muskeln M. complexus (1), M. splenius (2), M.rhomboideus capitis (3) und M. biventer (4) ..... 85

**Abbildung 31** MR Aufnahmen des Versuchstieres #13 nach Translations-Extensionstrauma (post-Exposition); Ansicht in der Frontalebene, Schnitt auf Höhe der Spitze des Processus spinosus von C6 (Stern), mit Markierung der Signalanhebungen der zervikalen Muskeln M. complexus (1) und M. splenius (2) ..... 86

**Abbildung 32** MRT - Aufnahmen des Versuchstieres #13 vor Translations-Extensionstrauma (pre-Exposition); Schnitt in der Sagittalebene paramedian links mit Markierung der zervikalen Muskeln M. complexus und M. splenius... 87



<b>Abbildung 33</b> MRT - Aufnahmen des Versuchstieres #13 nach Translations-Extensionstrauma (post-Exposition); Schnitt in der Sagittalebene paramedian links mit Markierung der Signalanhebungen der zervikalen Muskeln M. complexus und M. splenius.....	88
<b>Abbildung 34</b> Darstellung eines Facettengelenkes (Höhe C3/4) im Frontalschnitt – Phasen-Kontrast-Röntgen .....	90
<b>Abbildung 35</b> Aufnahme von Facettengelenken Höhe C4/5 im MR (oben) und im Phasen-Kontrast-Röntgen (unten).....	91
<b>Abbildung 36</b> Schwein # 8: Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden.....	136
<b>Abbildung 37</b> Schwein # 9: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	136
<b>Abbildung 38</b> Schwein # 10: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	137
<b>Abbildung 39</b> Schwein # 11: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	137
<b>Abbildung 40</b> Schwein # 12: Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden.....	138
<b>Abbildung 41</b> Schwein # 13 Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden.....	138
<b>Abbildung 42</b> Schwein # 14: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	139
<b>Abbildung 43</b> Schwein # 15: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	139
<b>Abbildung 44</b> Schwein # 16: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	140
<b>Abbildung 45</b> Schwein # 17: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden .....	140
<b>Abbildung 46</b> Mittelwerte der drei Negativkontrollen Überlebenszeit der Tiere, vier Stunden.....	141
<b>Abbildung 47</b> Mittelwerte von zwei Negativkontrollen ohne Ausreisserwert; .... Überlebenszeit der Tiere, vier Stunden.....	141
<b>Abbildung 48</b> Mittelwerte der sieben exponierten Tiere; einmalige Exposition (800N) mit einer Überlebenszeit der Tiere von vier Stunden .....	142
<b>Abbildung 49</b> Ansicht des M. rhomboideus rechtsseitig nach Freipräparation der Fettschicht sowie des Hautmuskels (Platysma).....	144

<b>Abbildung 50</b> Ansicht der Mm. rhomboidei cervicis und capitis linksseitig nach Freipräparation des Fettgewebes und der Platysma.....	145
<b>Abbildung 51</b> Ansicht des M. biventer nach Freipräparation der Mm. rhomboidei cervicis und capitis.....	145
<b>Abbildung 52</b> Ansicht des M. biventer und des M. complexus rechts- und linksseitig. Der M. biventer zusammen mit dem M. complexus im Schwein, entspricht dem M. semispinalis capitis im Menschen. Nach Freipräparation des M. rhomodeus cervicis, stellt sich in der nächsten Muskelebenen der M. splenius dar welcher hier als Nummer 4 markiert ist.....	146
<b>Abbildung 53</b> Darstellung des M. longissimus nach Freipräparation des M. biventer und M. complexus, sowie des M. splenius.....	146
<b>Abbildung 54</b> Darstellung des M. longissimus rechts- und linksseitig.....	147
<b>Abbildung 55</b> Darstellung des M. rectus capitis dorsalis major. Ansicht nach Freipräparation des M. longissimus.....	147
<b>Abbildung 56</b> Ansicht des M.obliquus capitis caudalis major in der tiefsten zervikalen Muskelebene nach Freipräparation des M. rectus.....	148

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Klinische Klassifikation von Störungen bei HWS-Beschleunigungsverletzungen der Quebec Task Force (QTF), übersetzt nach (Spitzer 1995)...	17
<b>Tabelle 2</b> Übersicht der oberflächlichen und tiefen posterioren/dorsalen zervikalen Muskeln.....	20
<b>Tabelle 3</b> Übersicht über die betroffenen Gewebe bei einer HWS-Distorsion: Theorie, Verletzungsmechanismus und klinischer Nachweis; aus Svensson 2000, Jansen 2008, Siegmund 2009 und Curatolo 2011 .....	24
<b>Tabelle 4</b> Testmatrix mit Angaben der Identifikationsnummer des Tieres, der zugehörigen Expositionsart, der Angabe der jeweils applizierten Zugkraft und der Überlebenszeit der Tiere.....	38
<b>Tabelle 5</b> Übersicht der entnommenen Muskeln des Schweines mit Benennung des menschlichen Pendants und der entsprechenden Funktion des jeweiligen Muskels .....	41
<b>Tabelle 6</b> Versuchsmatrix mit jeweiliger Identifikation des Versuchstieres, dessen Gewicht und Angabe der durchgeführten Analysen .....	44
<b>Tabelle 7</b> Übersicht der Probenzahl für jeden der acht untersuchten Muskeln von exponierten und nicht-exponierten Tieren .....	65
<b>Tabelle 8</b> Quantitative Detailauswertung der Muskelpräparate bei welchen Einblutungen befundet wurden.....	71
<b>Tabelle 9</b> Qualitative Auswertung der Einblutungen mit Angabe der Muskelbezeichnung .....	71
<b>Tabelle 10</b> Prozentuales Vorkommen von Verletzungen pro Schwein. Vorkommen von Einblutungen und Befundung allgemeiner Verletzungszeichen (Schwein ID, laut Tabelle 4 und Tabelle 6). .....	77
<b>Tabelle 11</b> Übersicht der Häufigkeiten der histologisch analysierten Facettengelenke in Bezug auf deren Entnahmehöhe und Entnahmeseite (NK = Negativkontrolle; Entnahme rechtsseitig).....	79
<b>Tabelle 12</b> Vorkommen von Einblutungen in Strukturen der Facettengelenke in Bezug auf die Häufigkeiten pro Facettengelenkshöhe bei exponierten Tieren	80
<b>Tabelle 13</b> Prozentuales Verletzungsvorkommen in Bezug auf die Facettengelenksseite- und höhe .....	81
<b>Tabelle 14</b> Rohdaten der Analyse des Serummarkers Kreatinkinase Muskeltyp in der Einheit $\mu\text{kat/L}$ und U/L pro Schwein zu jeweils sieben verschiedenen Entnahmezeitpunkten .....	134
<b>Tabelle 15</b> Protokoll der MRT-Aufnahmen vor und nach Traumasetzung .....	143

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest	Aqua destillata
ADSEAT	Adaptive Seat to Reduce Neck Injury to Reduce Injury for Female and Male Occupants
CK-MM	Kreatinkinase-Muskeltyp
CSD	Cervical Spine Distortion
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
EtOH	Ethanol
Fig.	Figure
GON	Großer Okzipitalnerv
HE	Hämatoxylin-Eosin
HWS	Halswirbelsäule
M.	Musculus
MAD	Mittlerer Arterieller Druck
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
N.	Nervus
N	Newton
NK	Negativkontrolle
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PMHS	Postmortem Human Subjects
QTF	Quebec Task Force
WAD	Whiplash-Associated Disorders

## 1. Einleitung

Der interdisziplinäre Forschungsbereich Biomechanik und Unfallforschung am Institut für Rechtsmedizin in München beschäftigt sich mit der Rekonstruktion und der Analyse von Unfällen im Straßenverkehr. In diesem Fachbereich arbeiten Wissenschaftler aus den verschiedensten Forschungsgebieten wie der Medizin, der Ingenieur- und Sportwissenschaften sowie Anthropologen, Epidemiologen und Physiker zusammen um zur Verbesserung der Prävention von Unfällen und deren Folgen beizutragen. Es werden hierbei Verletzungen und Verletzungsmechanismen unter verschiedenen Aspekten untersucht.

Ein Schwerpunkt der Abteilung für Unfallforschung liegt in der Unfalldetermination, in der Analyse von speziellen Unfallmechanismen und der Prävention. Ein *weiterer* Schwerpunkt liegt in der epidemiologischen sowie in der medizinisch-biomechanischen Grundlagenforschung der Distorsion der Halswirbelsäule (HWS) bei Auffahrunfällen, mit der sich auch vorliegende Arbeit beschäftigt.

Trotz jahrzehntelanger Forschung werden die Beschleunigungsverletzungen der HWS im Zuge von Verkehrsunfällen noch immer kontrovers diskutiert. Das Vorhandensein von reellen physischen Gewebsverletzungen wird teilweise immer noch in Frage gestellt. Das Forschungsinteresse in diesem Bereich der Trauma-Biomechanik ist immer noch groß, da sich die Schadensaufwendungen allein in Europa auf ca. 6 Milliarden Euro jährlich belaufen (Schick, 2013). Ein besonderer Diskussionspunkt in diesem Forschungsgebiet ist auch der Verletzungsmechanismus, der ursprünglich vermutet einen Schleudermechanismus unterstellt, was jedoch in der Realität nicht zutreffend ist. Daher stammte auch der Begriff „Schleudertrauma“.

Die Begrifflichkeiten der Verletzung respektive des Verletzungsmechanismus sind meist nicht scharf definiert und bezeichnen Unterschiedliches: eine Verletzung, den Verletzungsmechanismus, sowie das Beschwerdebild. Zur Beschreibung der Symptomatik sollte

eigentlich von einem "posttraumatischem Zervikalsyndrom nach Beschleunigungsverletzung" gesprochen werden (Meibom, 2006).

Im Weiteren wird der Begriff HWS-Distorsion für die Diagnose und das Beschwerdebild verwendet. Der bei einem Heckaufprall zugrundeliegende Mechanismus ist eine Translations-Extensions-Bewegung, hervorgerufen durch einen Akzelerations-Dezelerations-Mechanismus bei einem Auffahrunfall. Durch die Einführung von Kopfstützen sollte eine Hyperextension heutzutage so gut wie nicht mehr vorkommen.

Studien aus verschiedensten Forschungsbereichen beschäftigten sich mit der Pathologie dieses Beschwerdebildes. Es stellt sich für Forscher folgende Frage: Ist die HWS-Distorsion eine spezifische Verletzung eines/r bestimmten zervikalen Gewebes/Struktur oder ist sie das Ergebnis aus verschiedensten Verletzungsformen- und -arten, die durch den Akzelerations-Dezelerations-Mechanismus hervorgerufen werden können?

Im Zuge des Europäischen Forschungsprojekts ADSEAT (Adaptive Seat to Reduce Neck Injury for Female and Male Occupants, 7. Rahmenprogramm, Projekt-Nr.: 233904) wurden in Versuchen mit Schweinen Verletzungen im Rahmen eines induzierten Translations-Extensions-Trauma im Tiermodell analysiert. Der Fokus lag dabei auf Untersuchungen von Serumproben, zervikalen Muskeln und Facettengelenken. Diese zervikalen Strukturen wurden mit unterschiedlichen diagnostischen Mitteln auf Verletzungen untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen dazu beitragen, mögliche Verletzungen der Strukturen der HWS nach induziertem, schwerem Translations-Extensionstrauma mit Hilfe von histologischen, biochemischen und bildgebenden Verfahren aufzuzeigen. Die hohe Energie unter der die Versuche durchgeführt wurden, die Übertragung auf das reale Unfallgeschehen sowie die Übertragbarkeit der Tierversuche auf den Menschen werden diskutiert.

## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Biomechanik und forensische Traumatologie

Die allgemeine Biomechanik ist die Wissenschaft, die die Methoden der Mechanik benutzt, um die Strukturen und Funktionen biologischer Systeme zu untersuchen. Unter anderem findet man die Anwendungsbereiche der Biomechanik im Sportbereich (z.B. Leistungssport), in der Orthopädie oder auch bei der Analyse von Verletzungen nach Unfällen (Trauma-Biomechanik).

Die Trauma-Biomechanik stellt im Bereich der forensischen Traumatologie einen wichtigen Forschungsbereich dar. Es wird dabei analysiert, welche Auswirkungen mechanische Belastungen auf den menschlichen Körper haben. Eine Verletzung entsteht, wenn individuelle Toleranzgrenzen überschritten werden und es damit zu reversiblen oder irreversiblen Kontinuitätsunterbrechungen des biologischen Gewebes kommt. Somit beschäftigt sich die Trauma-Biomechanik mit der Verletzungsfrage und untersucht die Mechanismen, die kausal für die Verletzungen sind. Verletzungen können durch unterschiedliche Gewaltformen entstehen. Dabei sind in diesem Kontext zwei Formen zur qualitativen Beschreibung der Gewalt zu unterscheiden.

1. *stumpfe Gewalt*: beschreibt sämtliche Gewaltformen die flächenhaft/breitflächig auf den Körper einwirken, wie z.B. durch Verkehrsunfälle, beigefügte Gewalt durch Faustschläge oder Fußtritte oder Sturz aus Stand oder größerer Höhe.

2. *scharfe beziehungsweise halbscharfe Gewalt*: als scharfe Gewalt werden in der Forensik Stich- und Schnittverletzungen zusammengefasst, die durch scharfe oder spitze Gegenstände hervorgerufen werden wie z.B. durch Messer, Schere, Nadel, Glassplitter, Dolche oder Rasierklingen. Verletzungen durch "halbscharfe Gewalt" weisen zusätzlich stumpfe Aspekte auf, z.B. wie bei Einwirkung von Axt- oder Beilklingen oder auch durch Schraubenzieher (Penning, 2006).

Die Kenntnis über die Gewaltform ist für die Aufklärung der Verletzungsursache von großer Bedeutung.

Bei einer Vielzahl von Forschungsaktivitäten in der Trauma-Biomechanik handelt es sich um Verletzungen durch Fahrzeugunfälle.

Dabei werden bei den Fahrzeugunfällen hauptsächlich PKW-Unfälle untersucht, bedingt durch die hohe Relevanz der verletzten/getöteten PKW-Insassen im Straßenverkehr. Bei der Begutachtung von Verletzungen im Zuge eines Verkehrsunfalls stellen sich aus Sicht der Trauma-Biomechanik die Fragen nach der Gewaltform sowie die damit verbundenen Schädigungsformen. Verletzungen im Zuge eines Verkehrsunfalls entstehen vor allem durch stumpfe Gewalteinwirkung, die je nach Stärke der Krafteinwirkung, deren Dauer und Richtung zu den verschiedensten Schädigungen führen. Bei Betrachtung der Verletzungen muss des Weiteren untersucht werden, ob diese direkt oder indirekt entstanden sind. Indirekte Verletzungen definieren sich dadurch, dass sie "abseits vom Ort der stumpfen Gewalteinwirkung" entstehen, z.B. typisch bei einem PKW-Frontalaufprall der Aortenabriss durch starke negative Beschleunigungskräfte, oder bei einem PKW-Heckaufprall die Halswirbelsäulen-Distorsion (HWS-Distorsion), welche durch eine schnelle Translations-Extensions-Flexionsbewegung ohne direkte externe Krafteinwirkung auf die zervikalen Strukturen entsteht.

## **2.2 Die HWS-Distorsion**

### **2.2.1 Begriffe und Definition**

Gay und Abbott benutzten 1953 den Begriff "Common Whiplash Injury" um den Unfallmechanismus mit dem nachfolgenden Beschwerdekomples im Sinne einer HWS-Distorsion zu beschreiben. Oft wurde der Begriff HWS-Schleudertrauma als Übersetzung für die englische Bezeichnung "whiplash injury" verwendet, was wörtlich übersetzt Peitschenhiebverletzung bedeutet. Dies stellt sich als unpassende Bezeichnung dar, um den Unfallmechanismus zu beschreiben.



Der Bewegungsmechanismus besteht nicht wie früher angenommen aus einer reinen Peitschenschlag-Bewegung, sondern aus einer Translationsbewegung mit nachfolgender bzw. kombinierter Rotation, welche ein hohes Verletzungsrisiko für die Strukturen der HWS bergen. Ursächlich für diese Bewegung ist ein Energietransfer im Rahmen eines Akzelerations-Dezelerations-Mechanismus. Hauptsächlich wird diese Verletzung im Rahmen eines Auffahrunfalls beschrieben, kann aber auch nach Frontalunfall und Seitenaufprall oder durch andere Ursachen wie z.B. den Sprung in flaches Gewässer oder im Rahmen eines direkten kranio-fazialen Anschlagtraumas des Kopfes auftreten.

Die gebräuchlichste Definition der HWS-Distorsion stammt aus dem Jahre 1995 von der Quebec Task Force (QTF) und lautet:

*"Whiplash is an acceleration-deceleration mechanism of energy transfer to the neck. It may result from "...motor vehicle collisions...". The impact may result in bony or soft tissue injuries, which in turn may lead to a variety of clinical manifestations (Whiplash-Associated- Disorders). "*

### **2.2.2 Der Bewegungsablauf beim Heckaufprall**

Durch den Aufprall werden das Fahrzeug und damit der Sitz plötzlich unter dem Insassen hinweg nach vorne beschleunigt. Sobald der Oberkörper vollständig an der Rückenlehne anliegt und an der Bewegung des Sitzes teilhaben kann, beginnt eine Relativbewegung zwischen Kopf und Oberkörper.

Zuerst bewegt sich der Kopf waagrecht nach hinten (in Relation zum Torso); dabei kommt es zu einer Parallelverschiebung der Wirbelkörper. Die HWS wird dabei S-förmig verformt. Zur Translation kommt durch die Trägheit des Kopfes eine Extensionsbewegung. Der Grad der Extension hängt davon ab, wie die Kopfstütze angebracht ist. Im weiteren Verlauf kommt es zu einem Vorschwingen in den Gurt, welcher den Torso abbremst. Es folgt eine Flexionsbewegung des Kopfes um die verschobene Rumpfposition wieder einzuholen. Am Ende der Restitutionsphase befinden sich Kopf und Rumpf wieder in Ihrer Ausgangsposition (siehe Abbildung 1).

Die folgende Einteilung der einzelnen Phasen während eines Auffahrunfalls orientiert sich an der von McConnell (1993) und Muser (2001):

#### 1. Initialstoß

Während des Initialstoßes wird das Auto nach vorne beschleunigt. Während der ersten 50-60 ms erreicht die Beschleunigung jedoch die Insassen noch nicht, d.h. jene befinden sich noch in Ihrer Ausgangsposition.

#### 2. Retraktion / Extension

Über die Rückenlehne erreicht die Beschleunigung nun den Torso der Insassen, was zu einer Beschleunigung nach vorne führt. Die Lehnenneigung und die Beschleunigungskräfte der Rückenlehne, die auf Becken, Lendenwirbelsäule und die Brustwirbelsäule wirken, führen zu einer Aufwärtsbewegung des Torso entlang der Rückenlehne und einer Streckung der Wirbelsäule – auch „Ramping“ genannt. Der Kopf verweilt aufgrund seiner Trägheit noch in der Ausgangsposition. Dieses Zusammenspiel zwingt die obere HWS in eine Flexionsstellung, die untere HWS in eine Extensionsstellung. Dieser Mechanismus führt dann zu einer S-Krümmung der HWS. Es findet hierbei keine Rotationsbewegung des Kopfes statt.

#### 3. Halsextension

Der Kopf befindet sich in relativer Extensionsstellung gegenüber des Oberkörpers, der sich weiterhin nach vorne bewegt. Diese Phase beginnt nach etwa 100 ms und dauert bis zu 150 ms.

#### 4. Protraktion/Flexion

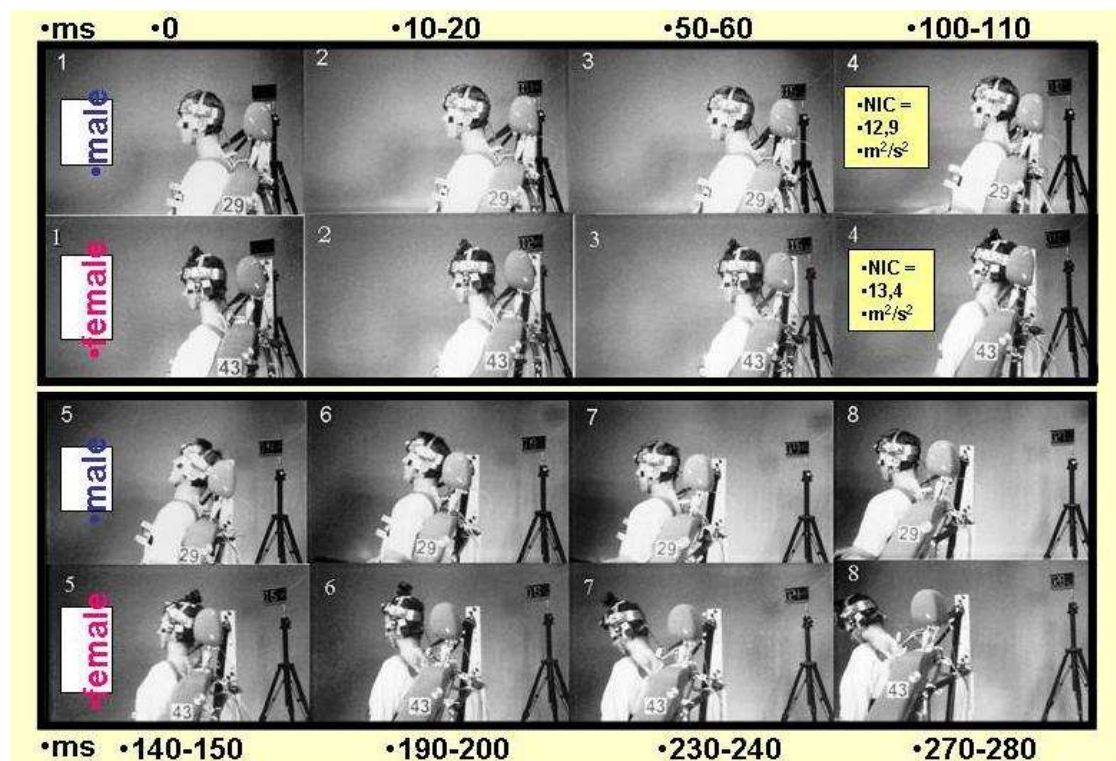
Nach dem Kopf-Kopfstützen-Kontakt beginnt die Bewegung des Kopfes nach vorne (ab etwa 190 ms). Die Vorwärtsbewegung des Thorax wird durch den Sicherheitsgurt gestoppt. Die Kraft des Gurtes setzt zuerst am Becken und Oberkörper an. Während die Bewegung des Thorax zurückgehalten wird, bewegt sich der Kopf weiterhin nach vorne. Dies könnte zu einer umgekehrten S-Krümmung der HWS führen,

welche aber nicht so starke Ausmaße einnimmt wie in der Retraktions-Extensions-Phase, da die Abbremsung der unteren HWS durch den Brustkorb abgefedert wird. Während der gesamten Reboundphase geht der Kopf von einer Extensions- in eine Flexionsstellung über.

#### 5. Restitutionsphase

Am Ende der Reboundbewegung bewegt sich der Kopf wieder in seine Ausgangsposition, da sich die Geschwindigkeiten von Oberkörper und Hals wieder angepasst haben (etwa 280 – 300 ms).

In Abbildung 1 wird der zeitliche Ablauf der einzelnen Phasen der HWS-Stellung des Insassen nochmals verdeutlicht.



**Abbildung 1** Einzelne Bewegungsphasen des Kopf-Hals Komplexes von männlichen und weiblichen Probanden bei einem Schlittenversuch (simulierter Heckaufprall) mit Angaben des ungefähren zeitlichen Verlaufs einer jeden Phase der HWS-Stellung. (Quelle: Hell, W. Institute for Vehicle Safety, GDV, 1999)

Durch das Trägheitsmoment des Kopfes in Relation zum Oberkörper kommt es im Bereich der HWS-Segmente zu Verschiebungen.

Penning, L. (1995) und Panjabi et al. (2004) studierten diese Kinematik und fanden heraus, dass die Retraktionsphase, also die Phase bei der der Kopf sich entlang der Horizontalebene bewegt, für die S-Verformung der Wirbelsäule verantwortlich ist und dies die größte Gewebsbelastung darstellt.

Yang (1997) beschreibt, dass der „Ramping-Effekt“ während der ersten Phase nach dem Anprall zu Kompressionskräften an den Wirbelkörpern führt, die wiederum die Scherbewegung zwischen den einzelnen Wirbeln fördern. Diese Gleitbewegung führt dann laut Kaneoka et al. (1999) dazu, dass die Facettengelenke sich unphysiologisch verschieben.

### 2.2.3 Verletzungsklassifikationen

Zusätzlich zu der Definition der „whiplash-associated-disorders“ (WAD) hat die Quebec Task Force (QTF) eine Schweregradeinteilung mittels einer evidenzbasierten Metaanalyse aus über 10.000 Veröffentlichungen vorgenommen. Es werden hierbei die klinischen Symptome in Verbindung mit einer HWS-Distorsion zusammengefasst. Die Einteilung erfolgt in vier Schweregrade anhand des klinischen Erscheinungsbildes (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1** Klinische Klassifikation von Störungen bei HWS-Beschleunigungsverletzungen der Quebec Task Force (QTF), übersetzt nach (Spitzer 1995).

Grad	klinisches Erscheinungsbild
0	keine HWS-Beschwerden, keine objektivierbaren Ausfälle
I	Nur HWS-Beschwerden in Form von Schmerzen, Steifigkeitsgefühl oder Überempfindlichkeit, keine objektivierbaren Ausfälle
II	HWS-Beschwerden wie unter I und muskuloskelettale Befunde (Bewegungseinschränkung, palpatorische Überempfindlichkeit)
III	HWS-Beschwerden wie unter I und neurologische Befunde (abgeschwächte oder aufgehobene Muskeleigenreflexe, Paresien, sensible Defizite)
IV	HWS-Beschwerden wie unter I und HWS-Fraktur oder -Dislokation

Die "Task Force on Neck Pain and Its Associated Disorders" hat sich zwischen den Jahren 2000 bis 2010 der Prävention, Diagnose, Behandlung und dem Umgang mit Nackenschmerzen gewidmet. In dieser Zeit wurden fast 32.000 Literaturstellen überprüft (Haldemann et al., 2008). Davon wurden folgend 1203 Artikel nachgeprüft. Neben Erkenntnissen über die Epidemiologie und der Risikofaktoren für Nackenschmerzen, hat die „Neck Pain Task Force“ eine aktualisierte Schweregradeinteilung, wiederum in vier Stufen, vorgenommen. Jedoch bezieht diese Einteilung zusätzlich therapeutische und klinische Problemstellungen mit ein. Es finden sich dort beispielsweise bei jedem der vier Schweregrade Anmerkungen zur Notwendigkeit für therapeutische Maßnahmen und zu weiteren Untersuchungen.

Gerade innerhalb des Schweregrads I ist es schwierig, Befunde objektivierbar zu machen. Bei Grad II können Symptome, respektive Beschwerden wie z.B. Bewegungseinschränkungen festgestellt werden, jedoch sind Verletzungen, z.B. durch bildgebende Verfahren, nicht nachweisbar. Symptome wie Muskelhartspann können zwar durch den behandelnden Arzt ertastet werden, sind aber unspezifisch und können auch andere Ursachen haben, wie z.B. langes Sitzen vor dem PC. Auch eine Steilstellung der HWS im Röntgenbild wird heutzutage nicht mehr als pathologischer Nachweis einer HWS-Distorsion anerkannt, da laut einer Studie von Helliwell et al. (1994) 42% der Normalbevölkerung einen solchen Befund aufweisen.

## **2.3 Die zervikale Wirbelsäule**

### **2.3.1. Anatomie der HWS und angrenzender Strukturen**

Das folgende Kapitel bezieht sich auf Informationen aus den Lehrbüchern Angewandte Physiologie (van den Berg, 1999), Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System (Nordin, 2001) und Principles of Anatomy&Physiology (Tortora, 2003).

Allgemein ist die Wirbelsäule (WS) eine lange Kette aus Knochen, Bandscheiben, Muskeln und Bändern, die sich von der Schädelbasis bis hin zur Spitze des Steißbeins erstreckt. Die WS hat eine Vielzahl von Aufgaben. Sie trägt nicht nur die Last von Kopf, Hals und Rumpf, sondern auch die der Arme und erfüllt somit eine essentielle Haltefunktion und ermöglicht Bewegungen des Körpers in alle Richtungen. Hauptsächlich sind die Wirbelkörper, also die knöchernen Strukturen, für die strukturelle Unterstützung verantwortlich.

Die HWS ist in der Regel der beweglichste (was sich aus der Verbindung zwischen Atlas und Axis ergibt), aber auch schwächste Wirbelsäulenabschnitt (anatomisch gesehen).

Die HWS besteht bei fast allen Säugetieren aus sieben Wirbelkörpern. Direkt unter dem Foramen Magnum des Schädels liegt der erste Halswirbel, der Atlas. Der Atlas, auch „Nicker“ genannt, besitzt als einziger Wirbel keinen wirklichen Wirbelkörper, sondern die sogenannte Massa lateralis. Er ermöglicht die Nick- beziehungsweise „Ja-Bewegung“ des Kopfes. Zusammen mit dem zweiten Wirbel, dem Axis („Dreher“), bildet der Atlas die Kopfgelenke. Anatomisch auffällig ist hierbei der Dens (Zahn) auf der Vorderseite des Wirbelkörpers. Dieser stellt entwicklungsstechnisch den fehlenden Wirbelkörper des Atlas dar. Anschliessend an C1/C2 folgt die untere HWS mit den Wirbeln C3 bis C7. Diese Wirbel besitzen weitgehend die typische Wirbelform, sind jedoch nicht nur an ihrer Größe (kleiner als die Brust- und Lendenwirbel) sondern auch an den Foramina transversaria (Knochenöffnungen) zu erkennen, die die Passage der Arteria vertebralis, ihrer Begleitnerven, sowie der sympathischen Nervenfasern ermöglichen.

Zwischen jeweils zwei benachbarten Wirbeln liegen die Bandscheiben (Disci intervertebrales), die zu den knorpeligen Knochenverbindungen zählen und als Bindegewebskissen zwischen den einzelnen Wirbelkörpern dazu dienen, axiale Stöße abzdämpfen und den Bewegungsumfang zu begrenzen. Die beiden caudal und cranial gelegenen Gelenkfortsätze aufeinander folgender Wirbel bilden die Facettengelenke, eines auf jeder Seite in Höhe C2/3 bis C6/7.

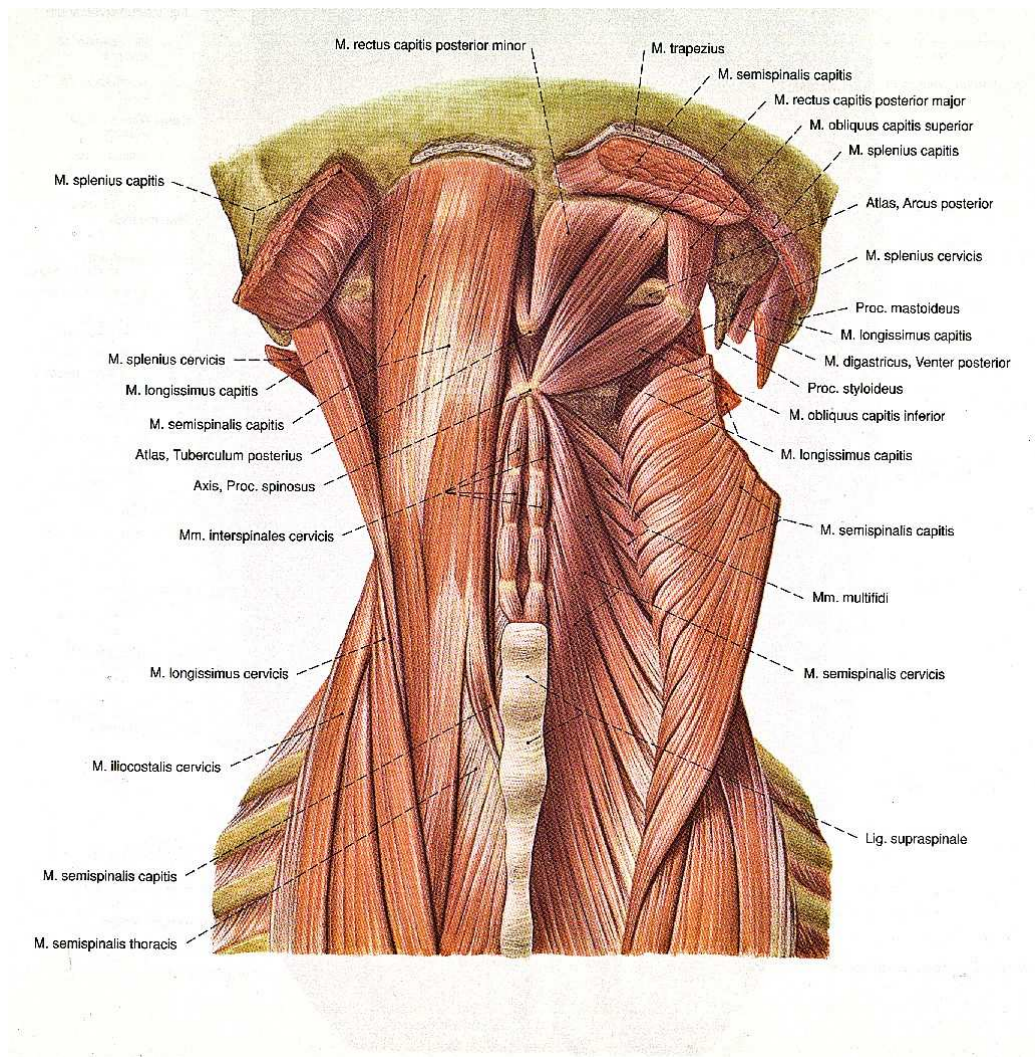
Diese Gelenke erlauben die Beugungsbewegung nach vorne, nach hinten, sowie die Rotationsbewegung um die Längsachse und limitieren zugleich das Überschreiten des physiologischen Bewegungsausmaßes. Muskeln stützen das Skelett und schützen es gleichzeitig, indem sie Belastungen verteilen. Sie ermöglichen die Bewegung der Knochen an den Gelenken und erhalten die Körperhaltung. Diese Fähigkeiten repräsentieren die Zusammenarbeit mehrerer Muskelgruppen und nicht einzelner Muskeln. Skelettmuskeln führen sowohl dynamische als auch statische Arbeit aus. Die dynamische Arbeit ermöglicht die Bewegungsausführung und Positionierung der einzelnen Körpersegmente. Statische Arbeit erhält die Körperhaltung respektive Körperposition. Die Konfiguration der Muskeln im Nackenbereich ist besonders komplex und lässt sich in eine oberflächliche und eine tiefe Muskelschicht unterteilen. Zu den oberflächlichen Muskeln zählen sowohl Muskeln der eingewanderten, als auch der autochtonen Rückenmuskeln. Bei den vier tiefen Nackenmuskeln unterscheidet man zwischen geraden und schrägen Muskeln. Sie werden alle vom N. suboccipitalis innerviert. Tabelle 2 beschreibt die oberflächlichen und tiefen zervikalen Muskeln.

**Tabelle 2** Übersicht der oberflächlichen und tiefen posterioren/dorsalen zervikalen Muskeln

<b>Oberflächliche Muskeln</b>	<b>Tiefe Muskeln</b>	
	gerade	<i>schräg</i>
M. trapezius	M. rectus capitis posterior minor	M. obliquus capitis superior
Mm. splenii	M. rectus capitis posterior major	M. obliquus capitis inferior
M. longissimus		
M. semispinalis		

Abbildung 2 illustriert die Übersicht zu den in Tabelle 2 angegebenen oberflächlichen und tiefen posterioren zervikalen Muskeln zur besseren Übersicht im Menschen.





**Abbildung 2** Übersicht der oberflächlichen und tiefen posterioren zervikalen Muskeln im Menschen (Quelle: Atlas der Anatomie des Menschen, Sobotta, Band 2, 21. Auflage, Seite 38).

Weitere Strukturen, die Stabilität und Beweglichkeit der Wirbelsäule gewährleisten, sind die Ligamente (Bandapparat). Die Ligamente sind faserige Bindegewebsstränge, welche die beweglichen Teile des Knochenskeletts miteinander verbinden (Verbindung von Knochen mit Knochen) und deren Beweglichkeit (Ausmaß der Streck-, Beuge- und Drehbewegungen) in ein physiologisches Bewegungsausmaß einschränken.

Die wichtigsten Ligamente im Bereich der oberen HWS sind das Ligamentum atlantooccipitale anterius, die Ligamenta alaria, sowie das Ligamentum cruciatum atlantis, die alle zur Stabilisierung der Kopfgelenke beitragen.



### **2.3.2 Hypothesen zu Verletzungen im Zervikalbereich**

Es wurde in anatomischen, biomechanischen, klinischen und epidemiologischen Bereichen geforscht, jedoch ist noch immer nicht belegt, welche Pathologien für die Beschwerden nach einem Auffahrunfall ursächlich sind. In der Vergangenheit wurden verschiedene Strukturen der zervikalen Wirbelsäule im Zusammenhang mit der HWS-Distorsion diskutiert. Einige Forscher vermuteten Verletzungen der Ligamente im Nacken wie z.B. die Ligamenta alaria oder auch die Ligamente der zervikalen Facettengelenke (MacNab, 1969; Jonsson et al., 1991; Siegmund et al., 2001; Ivancic et al., 2004). Diese Annahmen sind jedoch sehr umstritten, auch wenn in früheren Studien der Nachweis von Rupturen der Ligamente im Nacken durch MRT-Aufnahmen nachgewiesen werden konnten (Krakenes et al., 2003; Kaale et al., 2005), werden diese Ergebnisse in anderen Studien in Frage gestellt (Pettersson et al., 1997; Myran et al., 2008). In der Literatur beruhen die Verletzungen der Ligamente hauptsächlich auf Erkenntnissen die durch biomechanische Simulationsmodelle untersucht wurden (Dvorak et al., 1988; Stermper et al., 2005 und 2006).

Der Verletzungsmechanismus der Facettengelenke wurde häufig durch biomechanische Tests simuliert und die facettengelenksinduzierte Schmerzreaktion konnte durch diagnostische Blocks nachgewiesen werden (Barnsley et al. 1995, Winkelstein et al. 2000, Lu et al. 2005, Stemper et al. 2005).

Auch konnten Verletzungen in den Spinalganglien im simuliertem Auffahrunfall, beziehungsweise in Autopsiestudien nach stumpfem Trauma nachgewiesen werden (Svensson 1993, Ortengren et al. 1996, Svensson et al. 1998, Taylor et al. 1998).

Verletzungen der Bandscheiben (Pettersson et al., 1997; Panjabi et al. 2004) oder Verletzungen der Arteria vertebralis (Seric et al., 2000; Reddy et al., 2002) wurden ebenfalls beschrieben.

Zervikale Muskeln werden ebenso im Zusammenhang mit einer HWS-Distorsion als Verletzungsort beschrieben. Es wurden Muskelhyperalgesien in klinischen Studien befundet.

Andere Wissenschaftler vermuteten, dass die zervikale Muskelreaktion für den Mechanismus der HWS-Distorsion eine Rolle spielen könnte. Dies wurde durch EMG-Messungen in Freiwilligenversuchen untersucht (Dehner et al., 2007).

Mit Hilfe von Tierversuchen wurden Verletzungen im Zuge von HWS-Distorsionen untersucht und grundlegende anatomische und physiologische Untersuchungen mit Strukturen der HWS angestellt, um bessere Kenntnisse über den Verletzungsmechanismus und Schmerzursachen zu erhalten. In Versuchen mit Schafen und Ziegen wurde die Verletzung der Facettengelenke in Zusammenhang mit neuronaler Aktivität und die neurophysiologischen und biomechanischen Grundlagen der Schmerzgenerierung in diesen Gelenken untersucht, um bessere Kenntnisse der Innervierung besonders der Facettengelenkskapseln zu bekommen (Chen et al. 2005, Lu et al. 2005, Cavanaugh et al. 2006). In Versuchen mit Nagetieren wurden Spinalganglien nach Verletzung der Facettengelenke untersucht und es fand sich ein Hinweis auf die Ursache für den facettengelenksvermittelten Schmerz in bestimmten Transmitter/ Rezeptor-Systemen der dorsalen Spinalganglien (Dong et al. 2012). In diesem Tiermodell wurden darüber hinaus strukturelle Veränderungen in den Ligamenten der zervikalen Facettengelenke nach Trauma gefunden (Quinn et al., 2007). Lee et al. (2004) untersuchten hingegen den Zusammenhang zwischen der Verletzungsmechanik der Facettengelenke und der Schmerzphysiologie und vermuten, dass Grenzwerte von Zugbelastungen der Facettengelenke überschritten werden, welche dann in Schmerzsymptomen resultieren. Thunberg et al. (2001) studierten die Verbindung zwischen den Rezeptoren der Facettengelenke und der Muskelspindeln der posterioren Rückenmuskeln im Katzenmodell und gaben an, dass dieser Zusammenhang wichtig für die Beschreibung der Pathologie der HWS-Distorsion sein könnte. Svensson et al. (1998) führten Druckmessungen im Spinalkanal während einer Translations-Extensions-Bewegung in Schweinen durch und fanden in immunhistologischen Untersuchungen der Spinalganglien apoptotische Nervenzellen.

Tabelle 3 zeigt die Strukturen der HWS-Region, die in der Literatur hauptsächlich im Zusammenhang mit der HWS-Distorsion diskutiert werden sowie den theoretischen Verletzungsmechanismus der jeweiligen Struktur.

**Tabelle 3** Übersicht über die betroffenen Gewebe bei einer HWS-Distorsion: Theorie, Verletzungsmechanismus und klinischer Nachweis; aus Svensson 2000, Jansen 2008, Siegmund 2009 und Curatolo 2011

	<b><i>Verletzungsort und– mechanismus in der Theorie</i></b>	<b><i>Klinischer Nachweis</i></b>
<b>Facettengelenke</b>	Quetschung der Synovialfalte alternativ Belastung oder Ruptur der Facettengelenkscapsel. Kompression des Gelenks und Gelenkscapselschäden wurden in Versuchen nachgewiesen. Capselbelastungen könnten die Morphologie der Gelenkscapsel verändern und somit die neuronale Signalübertragung und die Schmerzreaktion verändern.	Die Blockade der sich medial verzweigenden Nerven an den Facettengelenkscapseln über Injektionen hat eine schmerzlindernde Wirkung in einem Teilkollektiv von Patienten gezeigt. Die zervikalen Facettengelenke sind allgemein ein verbreiteter Entstehungsort bei Nackenschmerzen.
<b>Muskeln</b>	Eine schnelle reaktive Kontraktion der zervikalen Muskeln, herbeigeführt durch eine Dehnung, führt zu erhöhter Belastung, die wahrscheinlich ausreicht eine Muskelverletzung hervorzurufen.	Bereiche der zervikalen Muskulatur werden oft von WAD-Patienten als Ort der Schmerzregion beschrieben. Allerdings könnte dieser Schmerz von anderen Strukturen ausstrahlen.
<b>Spinalganglien</b>	Verengung der Foramina intervertebralia durch Bewegung oder schnelle Ausdehnung des venösen Plexus rund um die Spinalganglien nach Druckänderungen im Wirbelkanal.	Viele periphere Symptome wie Nackenschmerzen, Schwindel, Kopfschmerzen, und neurologische Symptome der oberen Extremität könnten durch Schäden an Spinalganglien erklärt werden. Hyperaktivität und geringere Reizschwellen im Zusammenhang mit WAD lassen eine veränderte zentrale Schmerzreaktion vermuten.
<b>Bandscheiben</b>	Reißen des vorderen Anulus fibrosus oder Bandscheibenvorfall aufgrund von Dehnung. Nozizeptive Nervenendigungen sind in diesen Strukturen vorhanden und können bei Verletzungen zur übermäßigen Schmerzreaktion führen. Die Hypothesen beruhen hauptsächlich auf post-mortem Leichen- und Tierversuchen.	Chronische degenerative Veränderungen konnten in radiologischen Studien nachgewiesen werden. Jedoch zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse in unterschiedlichen Studien.

<b>Arteria vertebralis</b>	Es kann zu Zerreissungen der Intima durch mögliche axiale Rotationsbewegung in Kombination mit einer Extensionsbewegung kommen. Dies könnte in Überdehnungen, Quetschungen oder Krämpfen mit Minderperfusion des Hirnstamms and der umliegenden Gewebe resultieren.	Höhere Inzidenzen von Dissektionen der zervikalen Arterien wurden unter WAD-Patienten festgestellt, obwohl die absoluten Zahlen gering sind.
<b>Bänder und Sehnen</b>	In Leichenversuchen konnten Risse des vorderen Längsbands durch Überschreiten des physiologischen Dehnungsvermögens nachgewiesen werden. Es zeigten sich interspinöse Verletzungen und Schäden des Ligamentum flavum und der supraspinalen Bänder	In MRT Aufnahmen konnten ligamentäre Rupturen und Instabilitäten nachgewiesen werden, jedoch keine Rupturen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Verletzungen in unterschiedlichen Geweben in einer Vielzahl von Untersuchungen dokumentiert wurden. Es handelt sich dabei um Versuche mit Tiermodellen, Postmortem Human Subjects (PMHS), Versuchen mit Freiwilligen und Patienten. Verletzungen wie Frakturen, Einengungen des Spinalkanals oder Bandscheibenvorfälle als QTF 4 Verletzungen im Zuge einer HWS-Distorsion wurden hier nicht betrachtet. Die Verletzungshypothesen betrachten Verletzungen in den QTF Graden 1-3, bei denen bisher klinisch keine Strukturverletzungen nachweisbar sind. Die meisten Verletzungen sind mit bildgebenden Verfahren nicht objektivierbar. Verletzungen der Facettengelenke konnten vorausgesagt werden und wurden mit Hilfe von Tiermodellen validiert. Für die Schmerzreaktion in Facettengelenken gibt es valide diagnostische Tests und erprobte Schmerztherapien (Barnsley et al., 1993).

Verletzungen der Spinalganglien, der Bandscheiben, Ligamente, Muskeln und der Vertebralarterien wurden hauptsächlich in biomechanischen Studien und Autopsiestudien belegt. Jedoch gibt es bisher keine validen diagnostischen Tests, die die klinische Relevanz bestätigen würden. Das Fehlen makroskopisch sichtbarer Gewebsverletzungen schließt jedoch das Vorhandensein von schmerzhaften Verletzungen nicht aus. Den eindeutigsten Nachweis von Verletzungen liefern Schmerzreaktionen in Facettengelenken, welche laut Curatolo et al. (2011) durch validierte diagnostische Tests nachgewiesen werden können.

## 2.4 Vorstellung des Projektes

Diese Arbeit wurde im Zuge des ADSEAT Projekts (Adaptive Seat to Reduce Neck Injury for Female and Male Occupants; Project No 233904, Workpackage 2 "Biological tests"; gefördert von der Europäischen Kommission als Teil des 7. Rahmenprogramms) durchgeführt.

Dieses Projekt wurde von der EU finanziert, um die Entwicklung sicherer Fahrzeugsitze für beide Geschlechter zu fördern. Da verschiedene Studien gezeigt haben, dass Frauen am häufigsten von diesen "Verletzungen" betroffen sind, wurde ein weibliches FE (Finite Elemente) Dummymodell namens EvaRID (Lemmen et al., 2012) entwickelt, um die Bewegungsabläufe und Belastungen nach Auffahrunfällen bei Frauen untersuchen zu können. Bisher gab es nur männliche Dummymodelle, wie beispielsweise den BioRID II (Davidsson et al., 1999).

Das Hauptziel dieses Projekts lag in der Verbesserung des Sitzkonzepts in Automobilen um generell die HWS-Distorsions-Fälle zu reduzieren und im speziellen einen Schwerpunkt auf adaptive Sicherheitssysteme zu legen. Das Projekt gliedert sich in 5 Arbeitspakete, sogenannte „Workpackages“ (WP), die gemeinsam zum Projektziel beitragen. Im Folgenden werden die einzelnen Arbeitseinheiten kurz vorgestellt, um einen Überblick über das Projekt und die verschiedenen Tätigkeiten zu geben (aus ADSEAT Annex I – „Description of Work“):

- Workpackage 1 – Real-World Data

Mit Hilfe einer umfangreichen Datenanalyse wurden Risiken bei Männern und Frauen in Zusammenhang mit WADs bei Auffahrunfällen epidemiologisch untersucht. Individuelle Risikofaktoren wie Größe, Gewicht etc. wurden anhand aktueller Literatur ermittelt. Das Schutzpotenzial von kürzlich eingeführten Anti-Whiplash Systemen wurde für weibliche und männliche Insassen untersucht, Crash-Puls-Charakteristika wurden für beide Geschlechter definiert um das Verletzungsrisiko in gering und hoch, sowie kurzfristig und langfristig für unterschiedliche Sitze abzuschätzen.

- Workpackage 2 – Biological Tests

Um Insassenmodelle für bestimmte Unfallszenarien entwickeln zu können, ist es notwendig grundlegende Kenntnisse über das dynamische Verhalten des Menschen zu besitzen. In diesem Workpackage wurden Daten dazu erhoben. Der Unterschied zwischen Männern und Frauen in der dynamischen Antwort im Auffahrunfall wurde mit Hilfe von Freiwilligenversuchen quantifiziert. Desweiteren wurden Leichenversuche mit männlichen und weiblichen Objekten durchgeführt. Bei diesen Tests wurden High-Speed Röntgenbilder während der Tests aufgenommen, um die Unterschiede der Geometrie des Nackens und der Kinematik von Männern und Frauen bei Auffahrunfällen zu untersuchen. Zusätzlich wurden in Tierversuchen zervikale Gewebe auf Verletzungen hin untersucht sowie der Verletzungsmechanismus mit Hilfe eines speziellen Versuchsaufbaus studiert.

- Workpackage 3 – Computational Modelling

Um zukünftig Fahrzeugsitze und Sicherheitssysteme für den Bereich "whiplash protection" evaluieren und entwickeln zu können, wurde der weibliche Dummy EvaRID entwickelt. Dafür wurden Daten von Freiwilligentests mit weiblichen Insassen untersucht und mit der dynamischen Antwort des Dummymodells verglichen. Für die Modellierung wurden Daten aus Workpackage 1 aus der Literatur, sowie Ergebnisse aus Workpackage 2 verwendet um die Grundlagen für den weiblichen Dummy zu bilden.

- Workpackage 4 – Injury Criteria / Threshold

In diesem Workpackage wurden die aktuell verwendeten Verletzungskriterien (z.B. NIC) bewertet, um die Verletzungsgefahr bei Frauen vorherzusagen. Es wurde hierbei geprüft, ob die bisher bekannten Kriterien und Grenzwerte auch für die Vorhersage des Verletzungsrisikos bei Frauen anwendbar sind und ob Modifizierungen

notwendig sind. Zur Beurteilung des weiblichen Verletzungsrisikos wurden zusätzlich Analysen mit Hilfe von Crash-Recorder-Daten durchgeführt. Desweiteren wurden Sitz-Dummy-Interaktionen in Bezug auf das Verletzungsrisiko in weiblichen Insassen untersucht und Verletzungsprädiktoren von Männern und Frauen auf Basis von Computersimulationen verglichen.

- Workpackage 5 – Seat evaluation guidelines

Die generelle Zielsetzung dieses Arbeitsbereichs war es, Evaluierungsrichtlinien und Strategien zu formulieren um die Schutzleistung von Autositzen zu verbessern. Bereits vorhandene Evaluierungsmethoden von Sitzen wie die der IIWPG und EuroNCAP wurden untersucht. Basierend auf den numerischen Simulationen wird die vielversprechendste Sitz-Evaluierung weiter untersucht und modifiziert, um die beste Kombination von Sitzeigenschaften zu finden. Sitz-Evaluierungsrichtlinien wurden dann formuliert und in einen numerischen Illustrator eingefügt. Es wurde dafür ein Software-Illustrator entwickelt, welcher eine einfache interaktive Demonstration von Verletzungsmechanismen erlaubt. Diese Software demonstriert, welchen Einfluss verschiedener Sitzparameter sowie das Geschlecht auf die HWS-Verletzungen haben. Zudem gibt der Illustrator dem Insassen Tipps und Anleitungen für eine sichere Fahrpraxis. Im Bereich des Sitzdesigns gibt das WP Empfehlungen zur Verbesserung, um die Sicherheit für den Insassen zu steigern.

## 2.5 Fragestellung vorliegender Arbeit

Es ist bis heute noch nicht umfassend belegt, welche Gewebe durch die plötzliche Translations-Extensionbewegung bei Auffahrunfällen geschädigt werden (können). Es gibt mehrere Strukturen im Bereich der zervikalen Wirbelsäule/ HWS, die häufig diskutiert werden. Gerade die zervikalen Facettengelenke stehen oft im Fokus der Untersuchungen im Zuge von HWS-Distorsionsverletzungen. Aber auch die zervikale Muskulatur und die Spinalnerven wurden bereits im Zusammenhang mit der HWS-Distorsion untersucht. Der Nachweis von Skelettmuskelverletzungen wird heutzutage oft mit spezifischen Serummarkern durchgeführt. In vorliegender Arbeit werden deshalb muskuläre Verletzungen histologisch untersucht wie auch biochemisch mit Hilfe des Nachweises von Muskelproteinen analysiert. Ebenfalls werden zervikale Facettengelenke histologisch auf Verletzungen untersucht. Da es ethisch unmöglich ist, bei lebenden Versuchspersonen oder Patienten Gewebe zu entnehmen und diese histologisch zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Tiermodell verwendet, welches es ermöglicht makroskopische, sowie mikroskopische Untersuchungen der zervikalen Strukturen durchzuführen. Mit Hilfe eines speziellen Versuchsaufbaus von der Chalmers Universität Göteborg, Schweden, wurden Schweine einer Translations-Extensionsbewegung mit sehr hoher Beschleunigung (ca. 20 g) ausgesetzt.

*Die allgemeine Fragestellung für die vorliegende Arbeit lautet:*

Können mit Hilfe des vorliegenden Versuchsaufbaus Verletzungen in der zervikalen Region beim Schwein induziert werden und können diese durch standardhistologische, biochemische und/ oder bildgebende Verfahren nachgewiesen werden?



*Im Detail sollen folgende Fragen beantwortet werden:*

1. Können Verletzungen der zervikalen Muskulatur und Facettengelenke mit Hilfe standardhistologischer Verfahren deutlich dargestellt werden?
2. Sind Serummarker wie die Kreatinkinase Muskeltyp (CK-MM) und das Myoglobin geeignet um Verletzungen der HWS-Skelettmuskulatur nachzuweisen?
3. Liegen Verletzungen im Bereich der zervikalen Muskeln vor, und wenn ja, in welcher Lokalisation (oberflächliche oder tiefe Muskeln)?
4. Liegen Verletzungen in den zervikalen Facettengelenken vor, und wenn ja, auf welcher Höhe (C2/3 bis C5/6) und in welcher Struktur?
5. Finden sich in den MRT-Aufnahmen eines Schweines Verletzungen in der zervikalen Muskulatur und decken sich diese mit den Ergebnissen der histologischen Untersuchungen?
6. Kann man mit Hilfe der neuartigen Phasen-Kontrast-Röntgenmethode Verletzungen in den zervikalen Facettengelenken nachweisen? Wie stellen sich die Strukturen im Vergleich zu MRT-Aufnahmen dar?

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere und ethische Aspekte**

Für die Versuche wurden insgesamt dreizehn männliche, kastrierte Schweine der Schwedischen Landrasse (Kreuzung aus Schwedischer/Norwegischer Landrasse und Yorkshire) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 29 kg (24 – 37,5 kg), einer Körperlänge von 118 cm (110 – 130 cm) und einem Alter von zweieinhalb bis drei Monaten verwendet. Zehn Schweine wurden einer Translations-Extensionsbewegung ausgesetzt, drei Schweine wurden als Negativkontrolle untersucht.

In diesem Projekt wurde den Tieren eine wirksame Anästhesie gemäß Protokoll (siehe Material und Methoden – Anästhesie und operative Vorbereitung) verabreicht. Die Genehmigung der Versuche wurde von der Ethikkommission für Tierforschung in Schweden (Stockholms Södra djurförsöksetiska nämnd, Södertörns Amtsgericht, S-141 84 HUDDINGE) erteilt (Nr. S149-10).

#### **3.2 Der Versuchsaufbau**

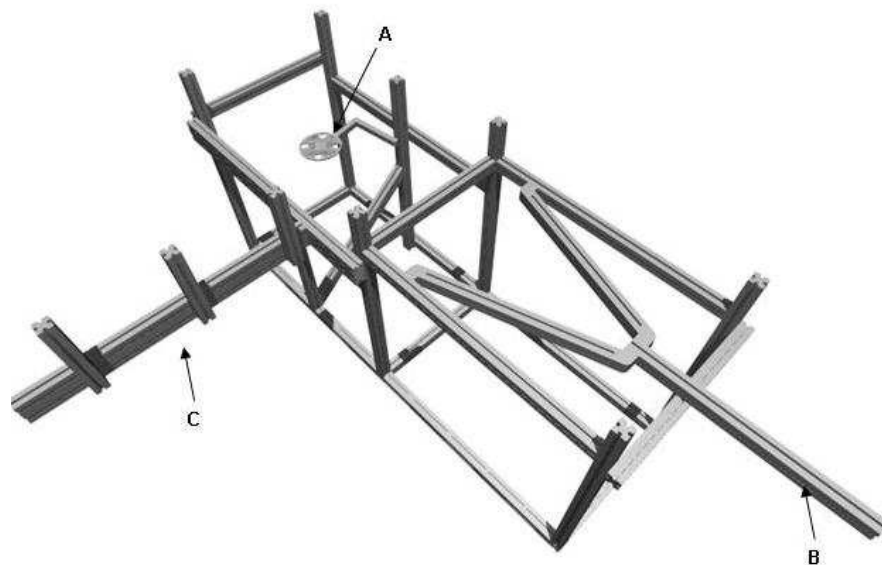
Die gesamte Versuchsanlage, inklusive Messtechnik, wurde von der Chalmers University of Technology, Göteborg, entwickelt und bereit gestellt. Diese stationäre Versuchsanlage aus Aluminiumprofilen wurde von Göteborg in das Södersjukhuset (sjukhuset = das Krankenhaus) nach Stockholm beziehungsweise, für die letzten Versuche, nach Uppsala in das Akademiska Sjukhuset überführt, wo die Tierversuche im Zuge des ADSEAT Teilprojekts 2.2 durchgeführt wurden. Diese circa 2,5 m x 0,69 m große Versuchsanlage ermöglicht es, die Versuchstiere einer Translations-Extensions-Bewegung der HWS auszusetzen, indem der Kopf durch Bewegung der Kopfplatte nach hinten gezogen wird während der restliche Körper in seiner ursprünglichen Position verweilt. Die Versuchstiere befinden sich dazu in Rechtsseitenlage. In der

Frontalebene trat keine Lateralflexion der Wirbelsäule auf, daher unterliegt rechts und links keinen unterschiedlichen Zugbelastungen.

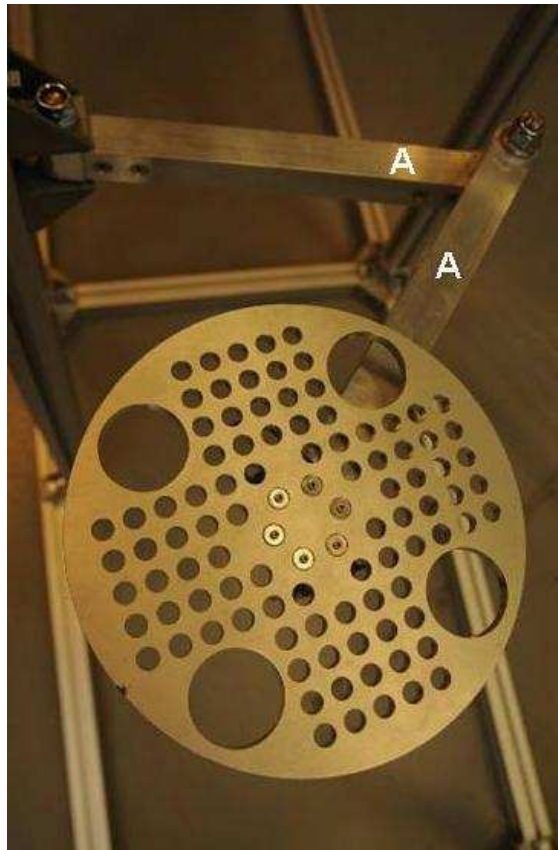
### 3.2.1 Die Versuchsanlage

Die stationäre Versuchsanlage besteht aus:

- einem Rahmen aus Aluminiumprofilen, der die Grundlage für die Versuchsanlage bildet (Abbildung 3).
- einer speziell angefertigten Kopf-Auflageplatte mit einer Gelenkverbindung (Abbildung 4), um dem Kopf eine freie lineare Bewegung und Rotation in der Sagittalebene zu ermöglichen
- einer Fixierung der Kopfauflegeplatte am Aluminiumrahmen nach ventral, durch ein handelsübliches Stück Kletterseil mit einer Zugkraft von mindestens 1kN, die durch einen Freisetzungsmechanismus für die Exposition gelöst werden kann (Abbildung 5).
- einer spannbaren Fixierung der Kopfauflegeplatte nach dorsal mittels Latexschläuchen, die durch eine Seilwinde händisch gespannt werden können (Abbildung 6).



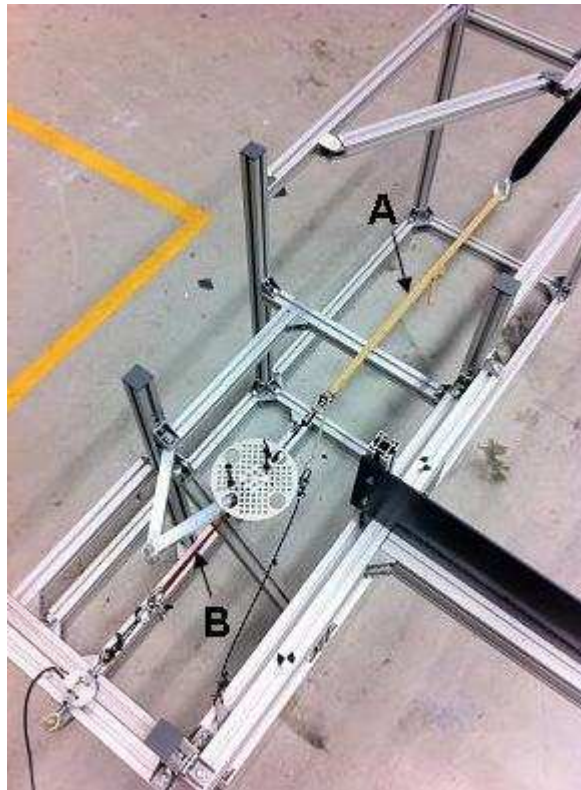
**Abbildung 3** Übersicht der kompletten Aluminium-Testanlage mit Abbildung der Kopfauflegeplatte (A), der Vorrichtung für die Seilwinde und Vorspannung der Latexschläuche (B) sowie der seitlichen Begrenzung für den OP-Tisch (C).



**Abbildung 4** Aufsicht der Kopf-Auflageplatte mit einem "Bi-fold Arm (A) zur freien Bewegung der Platte in Ihrer Sagittalebene



**Abbildung 5** Ansicht der Kopf-Auflageplatte von unten, Darstellung der U-Bolzen (Schäkel) für die Befestigung des Freisetzungsmechanismus (A1) sowie der Latexschläuche (A2).



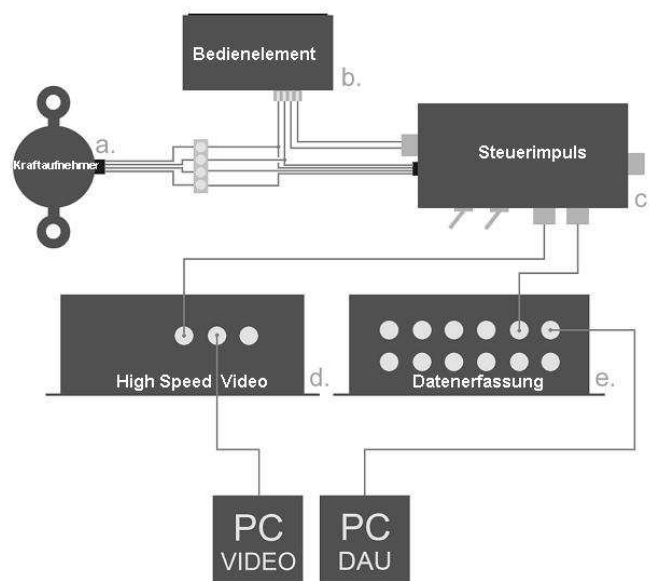
**Abbildung 6** komplette Testanlage mit Ansicht auf gespannte Latexschläuche (A) und den Freisetzungsmechanismus (B).

### 3.2.2 Die Messtechnik

Abbildung 7 zeigt den Aufbau der Messgeräte, die für die Erfassung der Beschleunigungsmessdaten, die Druckmessung im Spinalkanal sowie die Überwachung der applizierten Kraft benutzt wurden. Der Kraftaufnehmer misst die Zugkraft (bis zu 300 kg). Das Bedienelement (Model: MICRA-M) wandelt das elektrische Signal des Kraftaufnehmers (beziehungsweise der Wägezelle, Model: TS) in Kraft um. Der Schäkel (verschließbarer Bügel der hier als Teil des Freisetzungsmechanismus gilt, Model: Wichard 2773) wird als Trigger und Auslöser benutzt.

Zur Synchronisation mehrerer Messgeräte wird ein gemeinsames Trigger-Signal benötigt. Der Triggermechanismus, der für die Testanlage benutzt wird, macht sich das Öffnen des Freisetzungsmechanismus zu nutze. Das Öffnen des Schäkels führt zu einem Spannungsabfall der gemessenen Spannung am Kraftaufnehmer.

Dass dieser Spannungsabfall als Auslöser (Trigger) genutzt werden kann, setzt voraus, dass das Messgerät in einem offenen Stromkreis getriggert wird. Da einige Messgeräte in einem geschlossenen Kreislauf getriggert werden, wurde ein Triggerkonverter konstruiert. Zur Datenaufzeichnung wurde ein Data BRICK 8-Kanal Kombigerät verwendet, was die Amplifizierung und Aufzeichnung der Daten ermöglicht.



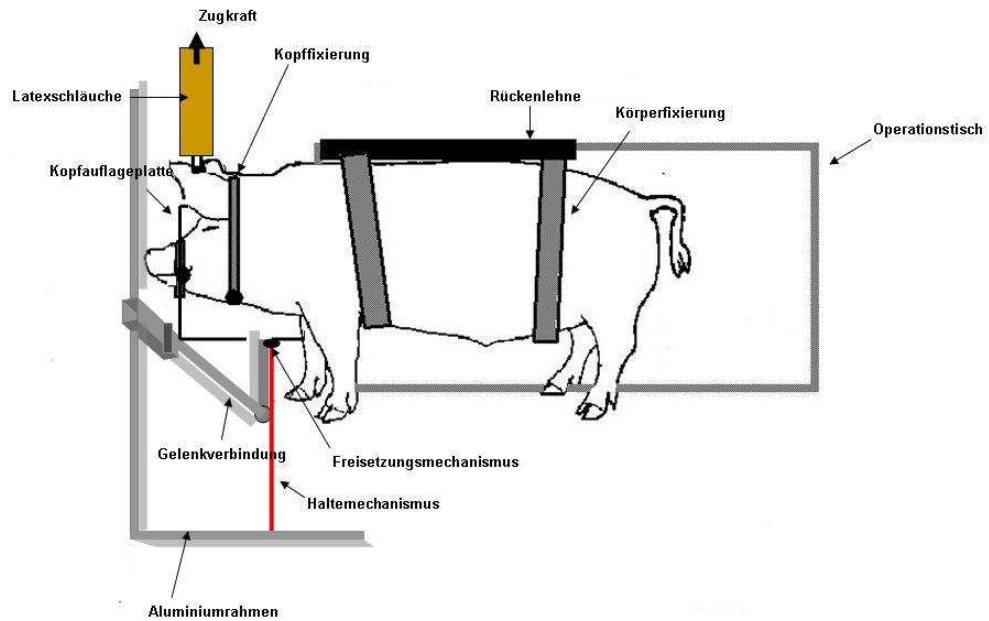
**Abbildung 7** Übersicht der einzelnen Messgeräte, die für die Erfassung der Beschleunigungsmessdaten, die Druckmessung im Spinalkanal sowie die Überwachung der applizierten Kraft benutzt wurden. (a = Kraftaufnehmer; b = Bedienelement; c = Steuerimpuls zur Lösung der Arretierung; d = High-Speed Video; e = Datenerfassung)

Um den Bewegungsablauf zu dokumentieren, wurden Marker auf den Köpfen der Tiere platziert und alle Expositionen mit einer High-Speed Kamera (Kodak PRO digital high-speed video, Kodak Inc., Rochester, NY, USA) aufgezeichnet. Beschleunigungsmesser wurden auf der Kopfauflegeplatte befestigt, eine in der Zugrichtung (x-Richtung), eine orthogonal (z-Richtung) dazu (EGC-500DS-100SC, Entran Devices, Hampton, VA, USA). Zwei zusätzliche Beschleunigungsmesser wurden auf dem Kopf der Tiere platziert, um eine Entkopplung zwischen Kopf und Kopfauflegeplatte zu detektieren.

## **3.3 Versuchsdurchführung**

### **3.3.1 Die Exposition**

Nach operativer Vorbereitung wurden die Tiere jeweils für mindestens 15 Minuten überwacht, bevor der Transport auf die Testanlage erfolgte. Die Tiere wurden dann in Rechtsseitenlage mit dem Kopf auf die Kopfauflageplatte gelegt, wo der Kiefer der Tiere durch zwei senkrecht orientierte Bolzen fixiert wurde (zwischen Ober- und Unterkiefer liegend), damit eine stabile Lage sichergestellt werden konnte. Der Rest des Körpers verweilte auf dem OP-Tisch und wurde mit gepolsterten Gurten an einer Rückenlehne fixiert. Die Hinter- und Vorderbeine der Schweine wurden leicht mit Baumwollbinden fixiert. Die Gelenkverbindung der Kopfauflageplatte war mit einem vorgespannten elastischen Gummiband verbunden, was bei Auslösung eine quasi-lineare Beschleunigung für eine kurze Zeit ermöglichte. Dies initialisierte die Translations-Extensions-Bewegung. Je nachdem wie viel Kraft vorgesehen war, um den Kopf zu beschleunigen, wurden mehr oder weniger Latexbänder verwendet, um die Zugspannung aufzubauen. Die Zugkraft beschleunigte dann bei Lösen des Freisetzungsmechanismus den Kopf nach hinten relativ zum fixierten Körper (Translationsbewegung, die in eine Extensionsbewegung übergeht). Eine schematische Zeichnung des Testaufbaus mit Blick von oben auf das Versuchstier ist in Abbildung 8 gegeben.



**Abbildung 8** Der Versuchsaufbau – Ansicht von oben: Das anästhesierte Tier liegt seitlich auf dem Operationstisch und ist fest mit der Rückenlehne verbunden. Der Kopf ist durch Bolzen fest mit der horizontal beweglichen Kopfauflageplatte verbunden. Auf der einen Seite der Kopfauflageplatte wird mit Hilfe von parallel aneinander gereihten Latexschläuchen die Zugkraft appliziert. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich der Freisetzungsmechanismus. Bei Lösen des Freisetzungsmechanismus wird der Kopf einer Translations-Extensionsbewegung ausgesetzt (Ortengren et al. 1996).

Zum Zeitpunkt der Exposition wurde die externe Beatmung kurz unterbrochen und die Beschleunigung der HWS mit Lösen des Freisetzungsmechanismus durchgeführt. Die Zugkraft wurde bei einmaliger Exposition auf 800 Newton festgesetzt, was einer durchschnittlichen Beschleunigung von etwa  $20 (\pm 2)$  g bei einer Pulsdauer von 40 ms entspricht. Bei mehrmaliger Exposition wurden unterschiedliche Zugkräfte festgesetzt (siehe Tabelle 4 - Testmatrix). Eine generierte Zugkraft auf die Kopfauflageplatte von 200N beziehungsweise 400N entspricht einer Beschleunigung von etwa 5 ( $\pm 0,5$ ) g beziehungsweise 10 ( $\pm 1$ ) g während der ersten 100 mm Weglänge. Nach Vollzug der Extensionsbewegung folgte die Bewegung des Kopfes nach vorne passiv zurück zur Ausgangsposition.



**Tabelle 4** Testmatrix mit Angaben der Identifikationsnummer des Tieres, der zugehörigen Expositionsart, der Angabe der jeweils applizierten Zugkraft und der Überlebenszeit der Tiere.

Schwein ID	Exposition*	Kraft (N)	Überlebenszeit in h
1	Mehrmalig	3 x 200, 4 x 400, 1 x 800	4
2	Mehrmalig	1 x 800, 9 x 200	4
3	Mehrmalig	2 x 800, 5 x 200	4
4	Mehrmalig	1 x 800, 2 x 600, 2 x 400, 3 x 200	4
5	Keine	0	4
6	Einmalig	800	6
7	Einmalig	800	6
8	Keine	0	6
9	Einmalig	800	4
10	Einmalig	800	4
11	Einmalig	800	4
12	Keine	0	4
13	Einmalig	800	9,5

\* die Expositionen wurden in Zeitabständen von 1 bis 1,5 Stunden durchgeführt.

### 3.3.2 Anästhesie, operative Vorbereitung und Überwachung

Für die initiale Anästhesie wurden 0,10 ml/kg Zoletil® 100 (Virbac) und 0,30 ml/kg Domitor® Vet. (Orion Pharma) intramuskulär verabreicht. Nach Wiegen der Schweine und Platzierung auf dem Operationstisch wurde die Narkose eingeleitet. Hierfür wurden 5 mg/kg Pentobarbitolnatrium (Apoteket Produktion & Laboratories) und 0,1 ml Atropin (0,02 mg/kg) (NM Pharma) intravenös durch einen peripher-venösen Zugang verabreicht. Atropin wurde gegeben, um die Schleimproduktion in den Atemwegen zu unterdrücken. Zur Erhaltung der Anästhesie wurden kontinuierlich Infusionen mit Ketalar® (Park-Davis) (50 mg/ml) 25 mg/kg/h zusammen mit Midazolam (Panpharma) (5 mg/ml) 0,042 mg/kg/h verabreicht. Während der ersten Stunde wurde den Tieren Glukose (Rehydrex®, Fresenius Kabi) (25 mg/ml) mit einer Infusionsrate von 250 ml/h verabreicht, danach waren es 90 ml/h.

Zunächst wurden die Tiere tracheotomiert und mit einem Beatmungsgerät (Hamilton-C2, Hamilton Medical AG, Bonaduz, Schweiz) verbunden. EKG-Elektroden wurden auf der Haut befestigt. Die Vena jugularis externa rechts wurde freipräpariert um einen Zugang für die Ketalarinfusionen zu legen.

Danach wurde die Arteria Carotis interna freipräpariert und mit einem Polyethylen-Katheter (Portex Ltd., Kent, England) kanüliert, um dort die kontinuierliche Messung des mittleren arteriellen Druckes vorzunehmen und arterielle Blutproben zu entnehmen. Die Vena Jugularis externa links wurde kanüliert, um auf diesem Wege einen Swan-Ganz-Katheter zu legen, mit dem das Herzminutenvolumen, der Lungenarteriendruck und der zentrale Venendruck gemessen wurden. Eine suprapubische Katheterisierung wurde vorgenommen, Urin wurde abgeleitet und die Urinmenge wurde für Überwachungszwecke gemessen.

Während des gesamten Experiments wurde volumenkontrolliert maschinell beatmet. Nur während der eigentlichen Exposition wurde die Beatmung für ca 30 Sekunden unterbrochen. Das Atemvolumen wurde auf circa 250 ml/kg/Minute und die Sauerstoffkonzentration auf 21% eingestellt. Um das Risiko einer Atelektase zu minimieren wurde ein positiver-endexpiratorischer Druck (PEEP) von 2-6 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Die Atemfrequenz wurde angepasst, um einen endexpiratorischen CO<sub>2</sub>-Partialdruck zwischen 4,5 und 5,7 zu erhalten und lag bei ca 25/Minute.

Die Sauerstoffsättigung sowie die Herzfrequenz wurden während der gesamten Dauer des Experiments mit Hilfe der Pulsoxymetrie überwacht. EKG-Ableitungen sowie der mittlere arterielle Druck (MAD) wurden mit Hilfe von Biopac MP 150 (Biopac systems, Goleta, CA, USA) registriert.

Das Atemminutenvolumen, die Temperatur, der endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Partialdruck und die Atemfrequenz wurden zum Zeitpunkt 0, nach zehn Minuten sowie nach 15 Minuten und dann alle 15 Minuten bis zu 60 Minuten nach Exposition und anschließend alle 30 Minuten bis Euthanasie registriert.

MAD und EKG wurden kontinuierlich gespeichert und ausgewertet. Für die Bestimmung der arteriellen Sauerstoffsättigung (SaO<sub>2</sub>), Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, pH, Laktat, Basenüberschuss, Blutzucker (GEM Premier 3000, Instrumentation Laboratories, Lexington, MA, USA), der Hämoglobinkonzentration im Blut (Haemoglobin Photometer Electrolux, Mecatronic AB, Helsingborg, Schweden) als auch des Serum-Myoglobins und der Serum-Kreatinkinase (Akkreditiertes Labor für

Klinische Chemie, Karolinska Universitätslabor, Stockholm, Schweden) wurden zu definierten Zeitintervallen Blut entnommen und analysiert siehe Abschnitt 3.7.1 – Datenerhebung der Serumproben.

Die Vitalparameter der Tiere wurden kontinuierlich überwacht. Die Blutproben wurden stündlich entnommen, und die Datenaufzeichnung wurde bis zum Ende der festgelegten Überlebenszeit des Tieres durchgeführt. Nach den jeweiligen Überlebenszeiten post Trauma wurden die Tiere mit einer lethalen Dosis Pentobarbital (100 mg/ml) unter EKG Überwachung euthanasiert. Nach Feststellung des Todes wurde unverzüglich mit der Probenentnahme begonnen.

### **3.4 Probenentnahme- und aufbereitung**

Eine Übersicht aller Muskel- und Facettengelenksentnahmen sowie die Durchführung von bildgebenden Maßnahmen und die Durchführung der CK-Analysen in Schweden ist in Tabelle 6 pro Schwein gegeben.

#### **3.4.1. Blutproben**

Alle Blutproben wurden direkt aus der Arteria Carotis interna entnommen. Die Blutproben wurden in 5 ml Serumröhrchen (BD Vacutainer SST™ II Advance, Plus Blood Collection Tubes, 5,0 ml 13 x 100mm) gefüllt. Die erste Probe wurde jeweils kurz nach der operativen Vorbereitung entnommen (Ausgangswert 1), die zweite Probe kurz vor der ersten Exposition (Ausgangswert 2). Die dritte Probe wurde ca. 30 Minuten nach Exposition entnommen, die nächste 60 Minuten nach Exposition, alle weiteren Proben jeweils alle 60 Minuten bis Euthanasie. Nachdem die Proben in 5 ml Serumröhrchen abgenommen wurden, erfolgte Inkubation auf Eis für 30 Minuten. Danach wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei 3800 rpm/4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Serum in 1 ml Aliquots in Eppendorf-Röhrchen abgefüllt und bis zum Transport in das Labor auf Trockeneis im Kühlschrank gelagert, längerfristige Lagerung erfolgte bei -80°C. Die Proben wurden dann

gesammelt zur Analyse der CK-MM und des Myoglobins in das Karolinska Krankenhaus in die Abteilung Klinische Chemie gegeben.

### 3.4.2. Muskelproben

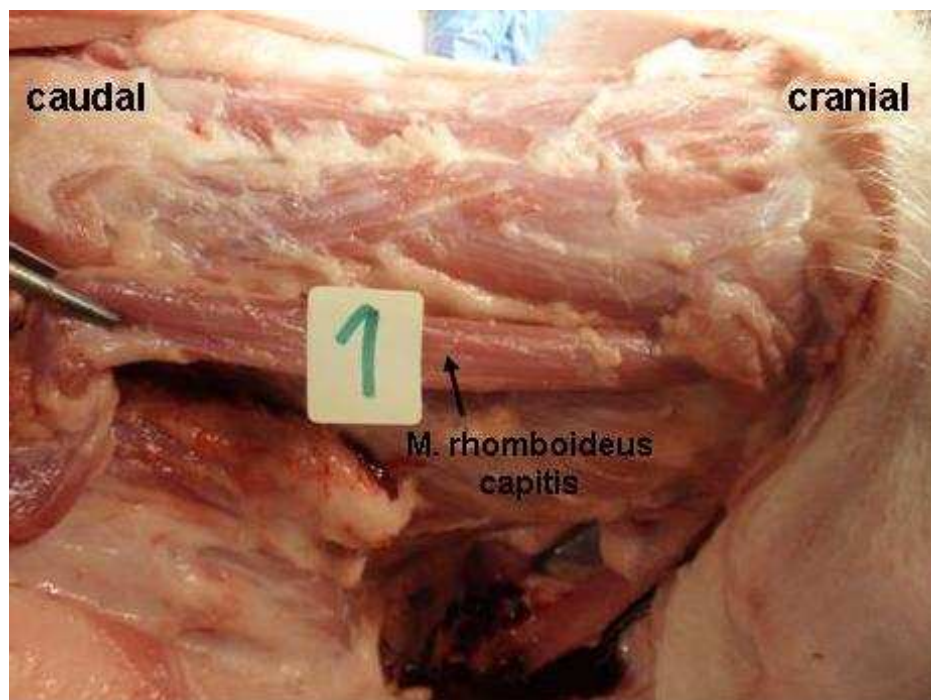
Nach Euthanasie wurden Proben der Muskulatur auf Höhe der HWS entnommen. Dabei wurden die Muskeln mit einem Skalpell Schicht für Schicht freipräpariert und zunächst auf makroskopische Einblutungen hin untersucht. Die Bezeichnungen der Muskeln im Schwein im Vergleich zum Menschen sind in Tabelle 5 gegeben. Eine Übersicht zur Muskelpräparation der einzelnen posterioren zervikalen Muskeln am Schwein ist in Anhang C gegeben. Die entnommenen Muskelproben aus dem Tier wurden jeweils erst nach ausreichender Fixierung (ca. 7-14 Tage; je nach Größe der Probe) in 4% gepuffertem Formalin (Apotek Produktion & Laboratorier AB, Schweden) für die histologische Untersuchung zugeschnitten.

**Tabelle 5** Übersicht der entnommenen Muskeln des Schweines mit Benennung des menschlichen Pendants und der entsprechenden Funktion des jeweiligen Muskels

	<b>Muskulatur Schwein</b>	<b>Muskulatur Mensch</b>	<b>Funktion</b>
1+ 2	Musculus rhomboideus capitis und cervicis	Musculus rhomboideus	Retraktion und Rotation des Schulterblatts
3+4	Musculus biventer cervicis und Musculus complexus	Musculus semispinalis capitis	Extension und laterale Flexion der Wirbelsäule
5	Musculus splenius - insertio atlantica	Musculus splenius cervicis	Extension, Rotation und laterale Flexion des Kopfes
6	Musculus longissimus capitis	Musculus longissimus capitis	Einseitig: Flexion des Kopfes und des Nackens zur ipsilateralen Seite Beidseitig: Extension der Wirbelsäule
7	Musculus rectus capitis dorsalis major	Musculus rectus capitis posterior major	Extension und Rotation des Atlanto-Occipital Gelenkes
8	Musculus obliquus capitis caudalis	Musculus obliquus capitis superior	Extension und Flexion des Kopfes zur ipsilateralen Seite

Als Negativkontrollen wurden von einem Schwein der Versuchsreihe ebenfalls alle acht Muskeln (siehe Tabelle 5) entnommen und histologisch analysiert. Als Artefakt-Ausschlusskontrolle wurde ein Muskel eines Schweines (M. biventer cervicis) entnommen bei dem ähnlich wie bei der Negativkontrolle keine Exposition durchgeführt wurde. Jedoch wurde der Muskel mit einer Pinzette vor Entnahme mehrmals stark gequetscht um auszuschliessen dass Einblutungen durch die Obduktion oder andere externe Einflüsse und nicht durch das induzierte Trauma entstehen konnten.

Abbildung 9 zeigt allgemein die Entnahme eines oberflächlichen Muskels, dem M. rhomboideus capitis.

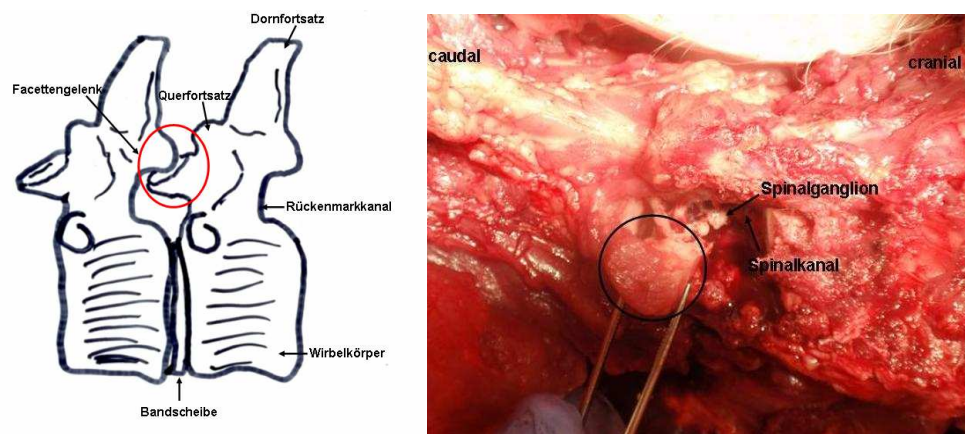


**Abbildung 9** Entnahme des rechten M. rhomboideus capitis (1).

### 3.4.3. Facettengelenksproben

Nach Entnahme der zervikalen Muskulatur wurden die Facettengelenke von C2/3 bis C5/6 entnommen. Zunächst wurde zur HWS präpariert, bis die Zwischenwirbelgelenke deutlich tastbar waren. Danach wurden die einzelnen Facettengelenke mit Hilfe einer oszillierenden Säge aus der Wirbelsäule herausgeschnitten, auf ihre Intaktheit hin überprüft und anschliessend zur Fixierung (mindestens 14 Tage) in 4% gepuffertes Formalin (Apotek Produktion & Laboratorier AB, Schweden) gegeben. Die Facettengelenke auf Höhe C6/7 konnten nicht entnommen werden, da die anatomischen Gegebenheiten beim Schwein dort keinen Zugang mit einer oszillierenden Säge ermöglichen.

Abbildung 10 zeigt eine Übersichtszeichnung eines Facettengelenkes zwischen zwei Wirbelkörpern, sowie ein Facettengelenk direkt bei der Entnahme aus dem Schwein.



**Abbildung 10** Links: Übersichtszeichnung zweier Wirbelkörper mit Markierung der Lage eines Facettengelenkes. Rechts: Ansicht eines Facettengelenkes auf Höhe C4/5 rechtsseitig bei Entnahme

In Tabelle 6 sind alle Muskel- und Facettengelenksentnahmen sowie die Durchführung des Ganzkörper-MRTs in Uppsala, des MRTs im Vergleich zum Phasen-Kontrast-Röntgen in den Facettengelenken und die CK- und Myoglobin-Analysen je Schwein aufgelistet.

**Tabelle 6** Versuchsmatrix mit jeweiliger Identifikation des Versuchstieres, dessen Gewicht und Angabe der durchgeführten Analysen

Schwein ID	Gewicht (kg)	Muskel-Entnahme	Facettengelenks-Entnahme	Ganzkörper – MRT pre-mortal**	MRT versus Phasen-Kontrast -Facettengelenke	CK-MM und Myoglobin
1	28	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
2	33	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
3	30	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
4	37,5	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
5*	30,5	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja
6	25	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
7	32	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
8*	24	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
9	25	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
10	27	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
11	32	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
12*	29	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
13	25	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein

\* = Negativkontrolle

\*\* = Ganzkörper-MRT pre-mortal vor und nach Exposition des Tieres

Tabelle 6 zeigt, dass von insgesamt 13 Versuchstieren, zehn einer Translations-Extensionsbewegung ausgesetzt wurden. Bei acht der 13 untersuchten Tiere wurde die posteriore HWS-Muskulatur entnommen und untersucht, eines davon galt als Negativkontrolle (Schwein 8). Bei zehn der 13 Tiere wurden Facettengelenke entnommen, zwei davon waren Negativkontrollen. Bei zwei Tieren wurden Facettengelenke entnommen um diese mit Hilfe des Phasen-Kontrast-Röntgenverfahrens und Vergleichsweise im MRT zu untersuchen, eines der Tiere galt als Negativkontrolle (Schwein 12). Bei einem der 13 Tiere wurde ein Ganzkörper-MRT vor und nach der Translations-Extensionsbewegung durchgeführt um die posteriore HWS-Muskulatur vor und nach Trauma mit einem bildgebenden Verfahren zu untersuchen (Schwein 13). Die Ergebnisse wurden später mit denen der histologischen Untersuchungen verglichen.



## **3.5 Histologische Untersuchungen – Muskulatur**

### **3.5.1 Fixierung und Einbettung**

Die entnommenen Muskelproben wurden für mindestens zehn Tage in einer gepufferten 4%igen Formalinlösung fixiert um eine einwandfreie Morphologie der Gewebe zu sichern.

Die entnommenen Muskelblöcke wurden nach Fixierung in 1 x 0,5 x 0,5 cm große Stücke zugeschnitten.

Vor der Einbettung wurden die Gewebeproben eine halbe Stunde mit Aqua dest gewässert um das Fixierungsmittel auszuwaschen. Die eigentliche Entwässerung erfolgte dann in der Einbettungsmaschine in Ethanol (EtOH) mit folgendem Programm:

- 2 x je 2 h 70% EtOH
- 2 x je 2 h 96 % EtOH
- 2 x je 1,5 h 100 % EtOH
- 3 x je 1 h Xylol
- 1 x 3 h Paraffin
- 1 x 6 h Paraffin

Aus dem heissen Paraffin (Paraplast Plus, Tissue Embedding Medium, McCornick Scientific, St. Louis, USA) wurden die Muskelgewebe dann in Blöcke gegossen und nach dem Erkalten bis zur Anfertigung der Schnitte im Gefrierfach bei -20°C aufbewahrt.

### **3.5.2 Schnittanfertigung**

Mit Hilfe eines manuellen Mikrotoms (Microm HM 400) wurden 5 µm dicke Schnitte des Muskelgewebes angefertigt. Die Schnitte wurden auf SuperFrost Objektträger (Menzel) aufgezogen und über Nacht im Trockenschrank getrocknet. Nach dem Schneiden und Trocknen im Brutschrank wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert, durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 90%, 80%, 70 %) wieder in ein wässriges Milieu überführt und schließlich in den jeweiligen



Färbelösungen gefärbt. Nach Färbung wurden die Schnitte getrocknet und danach wiederum entwässert. Dabei wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (70 - 80 - 90 – 100 %) und danach in Xylol gegeben. Zum Schluss wurde mit Hilfe eines Einschlussmediums (Histofluid) eingedeckt.

### **3.5.3 Färbungen**

#### **3.5.3.1 Hämatoxylin-Eosin (HE) – Färbung**

Die HE-Färbung ist die häufigste Routinefärbung in der Histologie. Sie dient in erster Linie als Übersichtsfärbung, um die Präparate unter den verschiedensten Gesichtspunkten beurteilen zu können.

Prinzip dieser Färbung ist, dass die Kerne zunächst mit der Hämatoxylinlösung gefärbt werden.

Die Kerne erscheinen dann in einem blau- bis dunkelviolettem Ton. Im zweiten Schritt wird gegengefärbt. Dies wird mit einem Xanthenfarbstoff wie z.B. Eosin B durchgeführt. Dabei werden Zytoplasma, Kollagen und Erythrozyten rot angefärbt.

Folgendes Färbeprotokoll wurde für diese Arbeit verwendet:

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und durch absteigende Alkoholreihe in wässrige Lösung gebracht (Abschluss mit 70% EtOH), da die Färbelösungen auf Wasserbasis beruhen. Danach erfolgte die Färbung der Kerne mit saurem Hämalan nach Weigert (Carl Roth GmbH; Karlsruhe) für zehn Minuten. Nach Färbung wurden die Schnitte für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert um die Blaufärbung zu verstärken. Es folgt die zweite Färbung mit einer 1%igen wässrigen Eosin B- Lösung (Carl Roth GmbH; Karlsruhe) für zehn Minuten. Es wurden zu 200 ml Eosin Fertiglösung 80 µl eines 100%igen Eisessigs gegeben. Danach wurden die Schnitte mit Aqua dest gespült. Zuletzt wurde in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils zwei Minuten differenziert und die Schnitte danach für zweimal fünf Minuten in Xylol gegeben; dies diente der finalen Dehydrierung vor Eindeckung der Schnitte.

### **3.5.3.2 Berlinerblau Färbung (Reaktion nach Perls)**

Die Anfärbung mit Berliner-Blau nach Perl dient zum Nachweis von Eisen ( $\text{Fe } 3^+$ ) in Makrophagen. Hämosiderin, welches intrazellulär vor allem in Makrophagen vorkommt, ist ein zellulär gebundenes Abbauprodukt des Blutfarbstoffes Hämoglobin und kann eindeutig in Einblutungsgebieten befundet werden, da es der Entsorgung von überschüssigem Eisen dient. Dreiwertiges Eisen lässt sich als blaue Körnchen nachweisen, die Zellkerne erscheinen rot (Mulisch 2010). Im Folgenden wurde diese Färbung dazu genutzt um vorhandene Einblutungen vor Versuch durch eventuelle Transportschäden der Versuchstiere oder Verletzungen der Muskulatur während des Aufenthaltes in den Tierstallungen etc. ausschliessen zu können.

Da die früheste Nachweisbarkeit von Hämosiderin 3 Tage beträgt (Betz 1999) und die Überlebenszeit der Tiere Post-Trauma nur maximal 9,5 Stunden, muss bei Nachweis von Hämosiderin beachtet werden, dass eventuelle Einblutungen schon vor dem Trauma induziert wurden.

Folgendes Protokoll wurde für den Nachweis verwendet:

Zunächst wurden die Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert und danach durch eine absteigende Alkoholreihe in Aqua dest gebracht. Danach wurden die Schnitte für 45 Minuten in eine Lösung bestehend aus 2% Ferrocyankalium (Kaliumhexacyanoferrat (II) – Trihydrat, Merck, Darmstadt) und 1% HCl (Carl Roth GmbH; Karlsruhe) gegeben. Nach 45-minütiger Inkubation wurde zweimal sorgfältig mit Aqua dest gewaschen. Es folgte eine Gegenfärbung mit Kernechtrot (Carl Roth GmbH; Karlsruhe) für 5 Minuten. Danach wurde wieder mit Aqua dest gespült. Zuletzt wurden die Schnitte in aufsteigende Alkoholreihe und anschliessend in Xylol gegeben.

### **3.5.3.3 Fibronektin Färbung**

Die Anfärbung von Fibronektin ist eine immunhistochemische Färbung zur Wundalterschätzung. Ausgewählte Muskelschnitte mit positiven Verletzungszeichen (laut H&E-Färbung) wurden mittels Darstellung von Fibronektin untersucht, um die Muskelverletzungen auf deren Vitalität hin zu untersuchen und damit eine postmortale Verletzungsentstehung durch beispielsweise die Autopsietechnik auszuschließen. Die Färbung wurde vom Institut für Pathologie des Klinikums München-Schwabing im Auftrag des Instituts für Rechtsmedizin und nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Die Paraffinschnitte wurden in Xylol für zweimal zehn Minuten entparaffiniert und danach durch eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 5 Minuten) bis zum Aqua dest hydratisiert.

Im Folgenden wurden die Schnitte zur Antigen-Demaskierung für zehn Minuten in einen Schnellkochtopf mit Citratpuffer (pH 6,0) gegeben. Danach wurden die Schnitte für 15 Minuten in Aqua dest gegeben. Anschließend wurden die Schnitte für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer (PBS) gewaschen. Es folgte Inkubation des ersten Antikörpers für 60 Minuten (Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronektin Code-Nr. A 0245, DAKO, Denmark) in einer Verdünnung von 1:800. Nach Inkubation wurde zweimal für jeweils zwei Minuten mit PBS gespült. Nach der Spülung wurden die Schnitte für 20 Minuten in PostBlock (Reagenz 2, gelb, Zytochem Plus AP Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin) gewaschen. Es folgt wiederum zweimalige Spülung für jeweils zwei Minuten in PBS. Es folgte ein zweiter Waschgang mit dem AP-Polymer (Reagenz 3, rot, Zytochem Plus AP Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin) für 20 Minuten, gefolgt von einem Spülschritt (zweimal zwei Minuten PBS). Danach wurde in Permanent AP Red (Magenta-Rot, Zytochem Plus AP Polymer Kit, Zytomed Systems, Berlin) für abermals 20 Minuten inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden die Schnitte für zweimal zwei Minuten in Aqua dest gebracht. Danach folgte Hämalaun Färbung nach Mayer für zwei Minuten und anschließend Bläuung unter Leitungswasser für abermals zwei Minuten. Danach wurden die Schnitte

in aufsteigende Alkoholreihe und Xylol (jeweils 2 Minuten) gegeben. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan® (Merck-Millipore, Darmstadt) eingedeckt.

### **3.6 Histologische Untersuchungen – Facettengelenke**

#### **3.6.1 Demineralisierung**

Von den Facettengelenken wurden Knorpel-Knochen-Schnitte hergestellt. Die verknöcherten Präparate mussten vorher demineralisiert werden. Dies wurde zunächst mit einer starken Säure (10% Salzsäure) versucht. Je nachdem wie groß die Facettengelenke waren respektive wie stark die Verknöcherung war, wurden die Gelenke bis zu 2 Wochen entkalkt. Als weitere, schonendere Methode, wurde die Entkalkung mit 10% EDTA über zwei Monate gewählt.

Die Herstellung einer 10%igen EDTA Lösung erfolgte nach folgendem Protokoll:

Zunächst wurden 100g Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz (Titriplex III, Best. Nr. X986.2, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in 100 ml Aqua dest aufgeschlämmt und anschließend in einem 1000 ml Kolben unter dauerndem Rühren erhitzt. Danach wurden 10 ml einer 40%igen NaOH Lösung zugesetzt. Aqua dest wurde bis zur 700 ml-Markierung aufgefüllt. Durch tropfenweisen Zusatz von 40% NaOH wurde die Lösung auf einen pH-Wert von 7,4 titriert und danach mit Aqua dest auf eine Gesamtmenge von 1000 ml aufgefüllt. Abbildung 11 zeigt ein Facettengelenk welches vor der Einbettung in der Transversalebene durchgeschnitten wurde.



**Abbildung 11** Ansicht der entkalkten Facettengelenke nach Schnitt in der Transversalebene vor Einbettung

### 3.6.2 Einbettung

Nach Wässerung über mehrere Stunden unter fließendem Leitungswasser erfolgte eine manuelle Einbettung über folgende Ethanolverdünnungen aufsteigender Konzentration:

- 3 x je 4 h 50% EtOH
- 2 x je 1 h 75 % EtOH
- 3 x je 1 h 96 % EtOH
- 3 x je 1 h 100% EtOH
- 2 x je 1 h Xylol
- 3 x je 4 h Paraffin

und schließlich zu Paraffin (über Nacht). Die Fertigung erfolgte teils an der Ausgießstation, teils manuell.

### 3.6.3 Schnittanfertigung

Die Schnitte wurden von der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilian-Universität angefertigt. Die Schnittdicke betrug etwa 5–7 µm. Alles weitere erfolgte wie in der Schnittanfertigung des Muskelgewebes.

### **3.6.4 Histologische Färbungen**

Bei den Facettengelenksschnitten wurden HE-Färbungen durchgeführt. Das angewandte Färbeprotokoll entsprach dem der Muskelschnitte und ist in Abschnitt 3.5.3 beschrieben. Bei den Facettengelenksschnitten wurden keine weiteren Färbungen durchgeführt.

### **3.6.5 Bildgebende Verfahren**

#### **3.6.5.1 Phasen-Kontrast-Röntgen**

Das Phasen-Kontrast-Röntgen ist eine neue Röntgentechnologie, die besonders bei der Darstellung von Weichgeweben und Grenzflächen von Geweben eine deutlich Verbesserung gegenüber anderen Röntgentechnologien zeigt. Da sich gerade das Knorpelgewebe bei der herkömmlichen Röntgenaufnahme nicht darstellen lässt, wurden Facettengelenksproben im Phasen-Kontrast-Röntgen untersucht, welches die unterschiedlichen Gewebe wie Knochen, Knorpel und Weichteilgewebe deutlicher differenziert.

Die Probengröße ist bei diesem neuen Röntgenverfahren, welches sich noch nicht in der klinischen Anwendung befindet, limitiert. Daher konnte auch jeweils nur ein Facettengelenk gescannt werden. Nach Entkalkung der Facettengelenke wurden jeweils 4 exponierte Facettengelenke (C2/3 bis C5/6 von Schwein Nr. 10) und 4 Negativkontrollen (C2/3 bis C5/6 von Schwein Nr.12) zur Analyse an die TU-München, Lehrstuhl für angewandte Biophysik, gegeben und dort analysiert.

Mit Hilfe von hochpräzisen Phasenkontrastgittern (Karlsruher Institut für Technologie) werden die Messungen vorgenommen. Der Aufbau verbindet eine Drehanoden-Röntgenröhre (ENRAF Nonius), einen Detektor zur Photonenzählung (Pilatus II von Dectris) und ein Talbot-Lau-Interferometer, bestehend aus drei Gittern. Das Quellengitter (G0) wird benötigt, um die Kohärenzanforderungen des Verfahrens zu erfüllen, die unter Anwendung herkömmlicher Röntgenverfahren nicht gegeben sind.

Das Phasengitter (G1) erzeugt ein Interferenzmuster, welches durch Einbringen einer Probe vor dem Gitter beeinflusst wird. Die Attenuation und die Phaseninformation können durch Analysieren dieser Änderungen mit Hilfe eines dritten Gitters (G2) und dem sogenannten „stepping approach“ extrahiert werden, indem die Akquisition mehrerer Bilder umfasst wird, während eines der Gitter vertikal übersetzt wird.

Die Gitter wurden von Microworks (Karlsruhe) hergestellt. Die Gitterperioden betragen  $5,4\text{ }\mu\text{m}$  und waren in einem symmetrischen Aufbau konfiguriert, mit integrierenden Abständen von  $81\text{ cm}$ . Das Phasengitter besteht aus Nickel und hat eine Höhe von ungefähr  $8\text{ }\mu\text{m}$ . Dieses Phasengitter leitet die Phasenverschiebung von  $\pi$  zu eingehenden Röntgenstrahlen mit einer Energie von  $22,8\text{ keV}$  ein. Die Höhen der goldenen Gitterstrukturen von G0 und G1 betragen etwa  $50\text{ }\mu\text{m}$ . Das Interferometer wurde  $60\text{ cm}$  entfernt von der Röntgenquelle installiert, welche mit einem Molybdän-Target betrieben wurde.

In beiden Messungen, Absorption und Phase, wurden Spannung und Strom auf  $40\text{ kV}$  und  $70\text{ mA}$  eingestellt. Für jede Probe wurden  $800$  Projektionen, mit jeweils  $11$  Schritten und einer Belichtungszeit von  $\approx 5$  Sekunden in einem  $360^\circ$ Winkel aufgenommen.

Die endgültigen Absorptions- und Phasenkontrast-Bilder sind aus den Projektionsdaten mit Hilfe eines Ram-Lak-Filter und eines Hilbert-Filter rekonstruiert worden. Die effektive Pixelgröße beträgt  $0,1 \times 0,1\text{ mm}$  aus einer Probenvergrößerung von  $1,72$  und Detektorpixel Größen von  $172 \times 172\text{ }\mu\text{m}$ . Die Messung eines Facettengelenks betrug jeweils etwa  $20$  Stunden. Diese neuartige Röntgentechnologie wird in dieser Arbeit als zusätzliches bildgebendes Verfahren zur besseren Darstellung der Facettengelenke genutzt.

### **3.6.5.2 Magnetresonanztomographie (MRT)**

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein bildgebendes Verfahren in der medizinischen Diagnostik, das sich gegenüber dem konventionellen Röntgenverfahren durch eine besonders gute Darstellbarkeit von Weichgeweben auszeichnet. Gerade für die Diagnostik beispielsweise von Einblutungen beziehungsweise Ödematisierung der HWS-Muskulatur ist dieses Verfahren sehr gut geeignet.

Von Versuchstier Nr. 13 wurden MRT Aufnahmen vor und nach Extensionstrauma in sagittaler und axialer Schnittführung gemacht. Die Aufnahmen wurden mit dem Gerät Achieva R2.6 von der Firma Phillips Medical Systems im Uppsala Akademiska Krankenhaus, Schweden erstellt. Das Modell Achieva SE zählt zu den geschlossenen Systemen und arbeitet mit einem 1,5 Tesla starken Magnetfeld.

Die gesamte Untersuchungszeit betrug etwa eine Stunde. Das Protokoll welches für die MRT Aufnahmen vor und nach Traumasetzung gewählt wurde befindet sich im Anhang 2 Tabelle 15.

Die MRT Aufnahmen wurden mit dem Programm Sante DICOM Viewer (Version 2.1.8) begutachtet und in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Radiologie des Klinikums Rechts der Isar in München ausgewertet. Die zervikale Muskulatur wurde auf Einblutungen beziehungsweise Ödembildung hin untersucht.



## **3.7 Datenerhebung und Befundung**

### **3.7.1 Datenerhebung der Serumproben**

Die Daten der Blutanalysen aus der klinischen Chemie (Karolinska Institutet, Stockholm) wurden in einer Exceltabelle (Microsoft Excel 2007) erhoben und ausgewertet.

Folgende Daten wurden für die Auswertung erhoben:

Blut wurde zu sieben verschiedenen Zeitpunkten/ Schwein analysiert. Die Zeitpunkte wurden jeweils mit den entsprechenden Ergebniswerten folgendermaßen in die Tabelle eingetragen.

- Ausgangswert 1 (Zeitpunkt -30 Minuten)
- Ausgangswert 2 (Zeitpunkt 0 Minuten)
- Zeitpunkt 30
- Zeitpunkt 60
- Zeitpunkt 120
- Zeitpunkt 180
- Zeitpunkt 240

Der Ausgangswert 1 entsprach dabei dem Zeitpunkt -30; d.h. dem Zeitpunkt unmittelbar nach der präoperativen Vorbereitung der Tiere beziehungsweise etwa 30 Minuten vor Durchführung der Translations-Extensionsbewegung. Der Ausgangswert 2 entsprach dem Zeitpunkt unmittelbar vor Durchführung der Translations-Extensionsbewegung. Die Zeitpunkte 30 – 240 entsprachen den Zeitpunkten (in Minuten) beginnend nach der Exposition der Tiere.

Es wurden zwei Blutmarker zur Untersuchung von muskulären Verletzungen am Schwein untersucht. Zum einen die CK-MM (Kreatinkinase-Muskeltyp) und zum anderen das Myoglobin, welches

gegebenenfalls zur Bestätigung einer muskulären Verletzung mit hinzugezogen wurde.

Der Blutmarker Kreatinkinase Muskeltyp (CK-MM) wurde in der SI-Einheit mikrokatal/L (Enzymaktivität) angegeben und in U/L umgerechnet ( $60 \mu\text{kat/L} = 1 \text{ U/L}$ ). Der Myoglobinwert wurde in Mikrogramm/L ( $\mu\text{g/L}$ ) angegeben.

### **3.7.2 Histologische Datenerhebung**

Alle Muskelschnitte wie auch Facettengelenksschnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioplan Mikroskops untersucht; pathologische Befunde, fragliche Befunde und Normalbefunde wurden mit einer Kamera mit integrierter Bearbeitungssoftware (Sony; Power HAD, 3CCD Color Video Kamera 12 V; Model: DXC-950P; Imaging Software: Imaplan V2.0) unter folgenden Vergrößerungen abfotografiert und analysiert: 2,5 x; 5 x; 10x und 20x. Die fotografierten Bildausschnitte betrugen 50, 100 und 200  $\mu\text{m}$ .

#### **3.7.2.1 Daten – und Befunderhebung zervikale Muskulatur**

##### ***a) HE-Färbung***

Die HE-gefärbten Muskelschnitte wurden nach folgenden Kriterien dokumentiert und befundet:

- Muskelbezeichnung
- Anzahl der Expositionen bei Traumasetzung (beziehungsweise Negativ- oder Artefakt-Ausschlusskontrolle)
- Überlebenszeit der Tiere
- Einblutung (1= ja/ 0= nein)
- Art der Blutung (1= fleckförmig; 2= flächenförmig; 3= beides; 9= unklar)

- Lokalisierung der Blutung (1= interstitiell; 2= intramuskulär; 3= beides; 9= andere)
- Zelluläre Reaktion (1= ja; 0= nein)
- Ödematisierung des Gewebes (Weitung des interstitiellen Raums)

Folgende Verletzungen, sowie zelluläre beziehungsweise entzündliche Reaktionen wurden erhoben:

- Leukozytäre Infiltration (neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten)
- Muskelfaserriss (Kontinuitätsunterbrechung der Muskelfasern mit großflächiger Zellinfiltration)
- Muskelfasernekrose (Muskelatrophie mit beginnender lymphozytärer/leukozytärer Infiltration; Abräumreaktion durch Makrophagen)

### ***b) Berliner Blau – Färbung***

Die Berliner-Blau gefärbten Muskelschnitte wurden auf Anwesenheit von Hämosiderin, dem Abbauprodukt von Hämoglobin, untersucht. Falls Hämosiderin im Schnitt als blaue Granule zu sehen ist, wird der Schnitt als positiv befundet. Der Schnitt wird als negativ befundet wenn im gesamten Schnitt keine Hämosiderinreaktion zu sehen ist.

### ***c) Fibronektin – Färbung***

Der Nachweis von Fibronektin wurde gemäß der Angaben von Betz et al. (1992) durchgeführt, nach dessen Angaben sich eine positive, also vitale Reaktion durch sich verzweigende und kräftig anfärbbare Strukturen (Fibrinnetze) kennzeichnet (Abbildung 12), die auch außerhalb des Wundrandes und der Blutungszone lokalisiert sind. Als

negativ wurde Schnitte gewertet, bei denen die Anfärbbarkeit nicht eindeutig war, beziehungsweise keine Fibrinnetzstruktur vorlag.



**Abbildung 12** Positive Fibronektinreaktion; Nachweis einer vitalen Reaktion durch typische Fibrin-Netzbildung. Übersicht einer vitalen Hautwunde nach zwei Tagen Überlebenszeit. (Quelle: Betz et al. 1993; Seite 23, Bild 3)

### 3.7.2.2 Daten- und Befunderhebung der zervikalen Facettengelenke

#### a) HE-Färbung

Die Daten der HE-gefärbten Facettengelenksschnitte wurden nach folgenden Kriterien erhoben:

- Facettengelenkshöhe (C2/3 – C5/6)
- Anzahl der Expositionen bei Traumasetzung
- Überlebenszeit des Tieres
- Einblutung (1= ja/ 0= nein)
- Lokalisierung der Blutung
- Vorliegen einer zellulären Reaktion (Granulozyten/Leukozyten)

Wie bei der Auswertung der zervikalen Muskulatur war auch hier das Vorkommen einer der oben genannten zellulären beziehungsweise entzündlichen Reaktionen für einen positiven zellulären Befund ausreichend.

### **3.7.3. Datenanalyse und Darstellung der Ergebnisse**

#### **3.7.3.1 Befundauswertung der Serumanalysen**

Die Datenauswertung der Blutmarker erfolgte im Excel-Programm (MSOffice, XP, Excel 2003). Dabei wurden die Blutwerte jedes einzelnen Versuchstiers und der Negativkontrollen zu den einzelnen Zeitpunkten Ausgangswert bis 240 Min. untersucht. Folgende Analysen wurden durchgeführt:

Die Werte der Serummarker im Blut wurden für jedes einzelne Versuchstier, Exponiert und Nicht-Exponiert (Negativkontrolle), einzeln erfasst und der relativen Änderung des jeweiligen Ausgangswerts (Mittelwert aus Ausgangswert 1 und 2) gegenübergestellt. Dabei konnte die prozentuale Änderung einzelner Werte im Zeitverlauf untersucht werden. Des Weiteren wurden die Mittelwerte der Schweine im Zeitverlauf ermittelt und mit den Mittelwerten der Negativkontrollen verglichen, um die Werte der Serummarker der exponierten und nicht-exponierten Tiere im Zeitverlauf beschreiben zu können. Zuletzt wurde die relative Änderung (in Prozent) der Werte von Exponierten- und Negativkontrolltieren in Relation zum Ausgangswert (Mittelwert + Standardabweichung) im Zeitverlauf untersucht.

#### **3.7.3.2 Befundauswertung der Muskulatur – histologisch**

##### ***a) Definition: Einblutung***

Eine Blutung wurde als fleckförmig eingestuft, wenn in einer ausgewählten Fläche von 200  $\mu\text{m}^2$  weniger als  $\frac{1}{4}$  dieses Ausschnitts mit Erythrozyten bedeckt war beziehungsweise diese nicht flächenmäßig verteilt vorkamen sondern eher einzeln auftraten. Als flächenförmige Einblutungen wurden solche Schnitte gewertet, bei denen  $> \frac{1}{4}$  der

untersuchten Fläche mit Erythrozyten bedeckt waren oder eine klare Weitläufigkeit der Einblutungen durch den gesamten Schnitt feststellbar war.

Eine Verletzung des Muskelgewebes, induziert durch das Extensionstrauma, lag definitionsgemäß vor, wenn mindestens einer der folgenden Punkte erfüllt war:

- Art und Lokalisation der Einblutung (fleckförmig und/ oder fleckenförmig; interstitiell und/ oder intramuskulär)
- Vorliegen vitaler Entzündungszeichen (leukozytäre beziehungsweise lymphozytäre Infiltration; Abräumreaktion durch Makrophagen oder Muskelfasernekrose)
- Vorliegen eines Muskelfaserrisses (Kontinuitätsunterbrechung der Muskelfasern mit großflächiger Zellinfiltration)

und keine dieser Verletzungszeichen in der Negativkontrolle vorlagen.

Ein Ausschluss von Verletzungen vor Versuch lag vor, wenn keine Hämosiderinreaktion im gesamten Schnitt zu sehen war. Dann wurde der Schnitt als negativ befundet. Als positiv galten Schnitte, wenn in Einblutungszonen mindestens eine eindeutige Hämosiderinreaktion vorlag, d.h. eindeutig blaufärbte Granule als Abbauprodukt des Hämoglobins vorlagen. Die Schnitte wurden ausschließlich als positiv oder negativ befundet.

Fibronektinschnitte konnten nur als eindeutig positiv gewertet werden, wenn eine klare Netzstruktur des Fibrins vorlag und diese Netzstruktur auch ausserhalb der Einblutungszone auftrat. Ein eindeutiger Unterschied zur Negativkontrolle (Schnitte von Schweinen die keinem Extensionstrauma ausgesetzt waren) musste gegeben sein. Die Schnitte wurden als positiv, negativ oder nicht auswertbar / uneindeutig befundet.

### ***b) Statistik***

In die Analyse ging jeweils eine Muskelprobe je Muskel(-bezeichnung) pro Versuchstier ein. In der Regel wurde der linke Muskel entnommen und in der Analyse verwendet. Bei drei Schweinen wurden beidseits alle Muskeln entnommen. Der Befund beider Muskeln wurde zusammengefasst, wobei positive Befunde beibehalten wurden. Die Begründung liegt hierbei in der gleichen Zugbelastung von links und rechts (siehe 3.2. Der Versuchsaufbau).

Bei dem für die Auswertung benutzten Programm handelt es sich um IBM SPSS Statistics 20.0.0. Es wurden die Häufigkeiten verschiedener Parameter, wie die Anzahl der Einblutungen pro Muskelbezeichnung, zelluläre und strukturelle Verletzungszeichen, sowie das allgemeine Verletzungsvorkommen untersucht. Diese werden tabellarisch entweder absolut oder prozentual dargestellt.

Die Verletzungsschwere bzw. Häufigkeit wurde folgendermaßen definiert: Anteil der verletzten Muskeln im Verhältnis zu der Anzahl an entnommenen Muskeln. Der Zusammenhang zwischen Muskeleinblutungen bzw. Verletzungsschwere mit der Überlebenszeit wurde mittel Chi<sup>2</sup> Test überprüft. Die entsprechenden p-Werte werden angegeben.

#### **3.7.3.3 Befundauswertung der Facettengelenke – histologisch**

Eine Verletzung der Facettengelenke, induziert durch das Extensionstrauma, lag definitionsgemäß dann vor, wenn einer der folgenden Punkte erfüllt war:

- Einblutungen in Weichgewebe und/ oder Knochen-Knorpelstrukturen
- Vorliegen vitaler Entzündungszeichen (leukozytäre beziehungsweise lymphozytäre Infiltration; Abräumreaktion durch Makrophagen)

und keine dieser Verletzungszeichen in den Negativkontrollen vorlagen.

Facettengelenke, die bereits durch die Entnahme beschädigt wurden, wurden von den Analysen ausgeschlossen.

Die Auswertung der Befunde erfolgte im Excel-Programm (MSOffice, XP, Excel 2003). Eine statistische Auswertung in SPSS wurde aufgrund der geringen Anzahl der befundbaren Facettengelenke nicht durchgeführt. Es wurden die Häufigkeiten der Facettengelenksverletzungen (hauptsächlich Einblutungen) nach Höhe (C2/3-C5/6), nach Entnahmeseite (links/rechts) und je Schwein untersucht.

### **3.7.4 Bildgebung**

#### **3.7.4.1 Muskeln**

Die MRT-Aufnahmen, die im Akademiska Sjukhuset an einem der Versuchstiere (Schwein Nr. 13) durchgeführt wurden, wurden in Zusammenarbeit mit der Radiologie des Klinikums Rechts der Isar befundet. Dabei wurden die Aufnahmen vor und nach Extensionstrauma auf Einblutungen und Ödematisierung des zervikalen Muskelgewebes untersucht.

#### **3.7.4.2 Facettengelenke**

Die Aufnahmen, die im Phasen-Kontrast-Röntgen durchgeführt wurden, sind zusammen mit MRT-Aufnahmen, die von den gleichen Gelenken gemacht wurden, untersucht worden. Die Aufnahmen des Phasen-Kontrast-Röntgens wurden zusammen mit den Aufnahmen aus dem MRT verglichen um Unterschiede in der Darstellung der einzelnen Strukturen zu untersuchen und gegebenenfalls Verletzungen im Phasen-Kontrast-Röntgen zu detektieren die sich im MRT nicht darstellen lassen und vice versa.



## 4. Ergebnisse

Dieses Kapitel fasst die Ergebnisse der Auswertung der Blutanalysen, der histologischen Untersuchungen, sowie der Bildgebung zusammen. Bei der Darstellung der klinischen Blutanalysen werden die Ergebnisse in der Einheit  $\mu\text{kat/L}$ , also der Enzymaktivität, quantitativ angegeben. Die Ergebnisse werden als Mittelwert graphisch in prozentualer Darstellungsweise in Bezug zum Ausgangswert präsentiert. Eine Tabelle mit den Ergebnissen der CK-Aktivität (in  $\mu\text{kat/L}$  und U/L) eines jeden Testschweines mit den jeweiligen Entnahmezeitpunkten, sowie die graphische Auswertung eines jeden Versuchstieres ist im Anhang (Tabelle 14) gegeben. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde keine statistische Analyse in Bezug auf die Signifikanz der Ergebnisse durchgeführt.

Die histologischen Ergebnisse werden quantitativ für die Muskulatur sowie für die Facettengelenke angegeben. Eine statistische Analyse wurde ausschließlich für die zervikalen Muskeln zur Untersuchung der Verletzungshäufigkeit in Abhängigkeit von Überlebenszeit und Exposition durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahlen wurden keine statistischen Tests mit den Ergebnissen der Facettengelenke durchgeführt.

Die Ergebnisse der Bildgebung für die zervikalen posterioren Muskeln werden anhand von MRT Aufnahmen dargestellt.

Für die Facettengelenke werden Aufnahmen von MRT und Phasen-Kontrast-Röntgen gegenüber gestellt.

## **4.1 Serumanalyse**

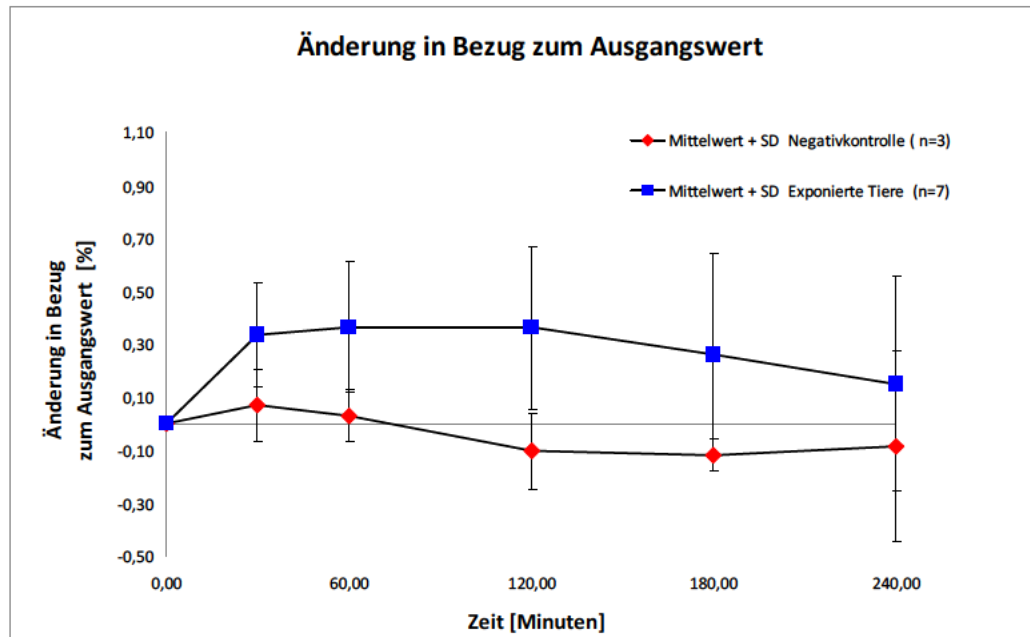
### **4.1.1 Myoglobin**

Die Serumanalysen des Myoglobins im porzinen Blut ergaben nur Fehlermeldungen. Die Daten konnten nicht ausgewertet werden. Es steht zur Diskussion ob der Humanmarker ungeeignet für die Analyse des Schweineserums war oder ob postmortale Veränderungen diese Fehlermeldungen induziert haben.

### **4.1.2 CK-MM**

Im Folgenden werden zunächst die Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) im Bezug zum Ausgangswert der Enzymaktivität der drei Negativkontrollen und der sieben exponierten Tiere im Zeitverlauf dargestellt. Für jedes einzelne Versuchstier sind die Verläufe im Anhang 1 abgebildet.

Abbildung 13 zeigt die prozentuale Enzymaktivität in Bezug zu den Mittelwerten der Ausgangswerte mit der Standardabweichung (SD) in graphischer Darstellungsweise.



**Abbildung 13** Prozentuale Änderung der durchschnittlichen CK-MM Enzymaktivitäten der exponierten Tiere und der Negativkontrollen in Bezug zum Ausgangswert (Mittelwert von Ausgangswert 1 und 2).

Der Verlauf der Enzymaktivität der exponierten Tiere in Abbildung 13 zeigt im Vergleich zu der Negativkontrolle einen deutlichen Anstieg der Enzymaktivität. Während der Wert bei den exponierten Tieren etwa bis zu zwei Stunden post Traumasetzung erhöht bleibt und danach langsam abfällt, sinkt der CK-Wert der Negativkontrolle schon nach 30 Minuten wieder ab und bleibt dann zwischen zwei und vier Stunden relativ konstant. Ein Unterschied ist 4 Stunden post Trauma zwischen Exponierten und Nicht-Exponierten nicht mehr nachweisbar (Überlappung der SD).

Im Anhang A1 (Tabelle 14) sind die Rohdaten der Analyse des Serummarkers Kreatinkinase aller Versuchstiere mit den einzelnen Entnahmezeitpunkten gelistet. In Abbildungen 36 - 48 sind die Kreatinkinase Aktivitäten aller einzelnen Versuchstiere graphisch dargestellt. Der Zeitpunkt 0 entspricht dabei immer dem Mittelwert der Ausgangswerte 1 und 2.

## 4.2 Histologische Analysen

### 4.2.1 Zervikale Muskulatur

Es konnten insgesamt 45 einzelne Muskelgewebsproben von sieben exponierten Tieren entnommen und analysiert werden. Acht verschiedene Muskeln wurden untersucht. Tabelle 7 präsentiert die Anzahl der analysierten Muskelgewebe für jeden der acht untersuchten Muskeln.

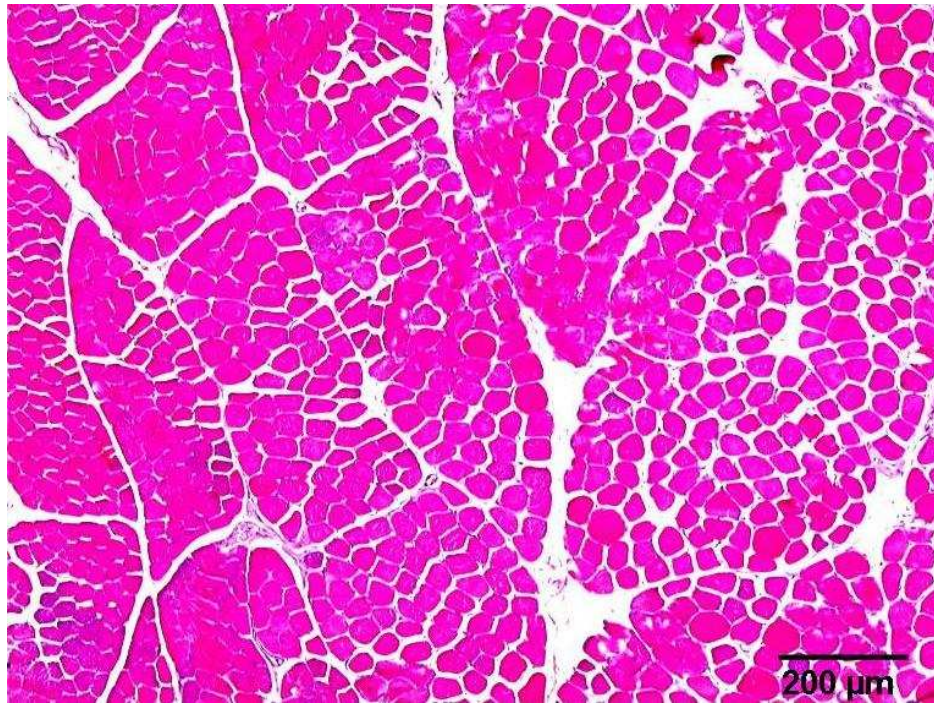
Von den 45 Muskelproben wurden 38 Proben (84,4 %) von fünf Schweinen entnommen, die einer einmaligen Exposition ausgesetzt waren und 7 (15,6 %) Muskelproben von zwei Schweinen die mehrmalig hintereinander dem Trauma ausgesetzt waren. Die Muskelproben der mehrmalig und einmalig exponierten Tiere werden zunächst zusammen betrachtet.

**Tabelle 7** Übersicht der Probenzahl für jeden der acht untersuchten Muskeln von exponierten und nicht-exponierten Tieren

von exponierten und nicht exponierten Tieren			
Muskelbezeichnung	Anzahl der exponierten Muskelgewebeproben		Anzahl der Negativkontrollen (nicht exponiert)
	einmalig exponiert	mehrmalig exponiert	
M. rhomboideus capitis	5	1	1
M. rhomboideus cervicis	5	0	1
M. biventer	5	1	1
M. complexus	5	1	1
M. longissimus	3	1	1
M. splenius	5	0	1
M. rectus	5	1	1
M. obliquus cranialis	5	2	1
GESAMT	38	7	8
	45		

Von einem nicht-exponierten Tier (Negativkontrolle) das eigens für die Muskelgewebsanalyse untersucht wurde, konnten von jedem der acht analysierten Muskeln jeweils eine Muskelprobe entnommen und analysiert werden. Diese wurden wie bei den exponierten Tieren auf Einblutungen, Ödematisierung und zelluläre sowie strukturelle Verletzungszeichen untersucht. Bei der Auswertung der Muskelproben konnte festgestellt werden, dass die Ödematisierung des Muskelgewebes nicht nur in exponierten Muskelproben nachweisbar ist, sondern auch in den Negativkontrollen. Einblutungen konnten in keiner der Negativkontrollen detektiert werden. Ebenso fanden sich keine zellulären Reaktionen, wie beispielsweise Entzündungszellen oder anderweitige Verletzungszeichen, wie Muskelfaserrisse.

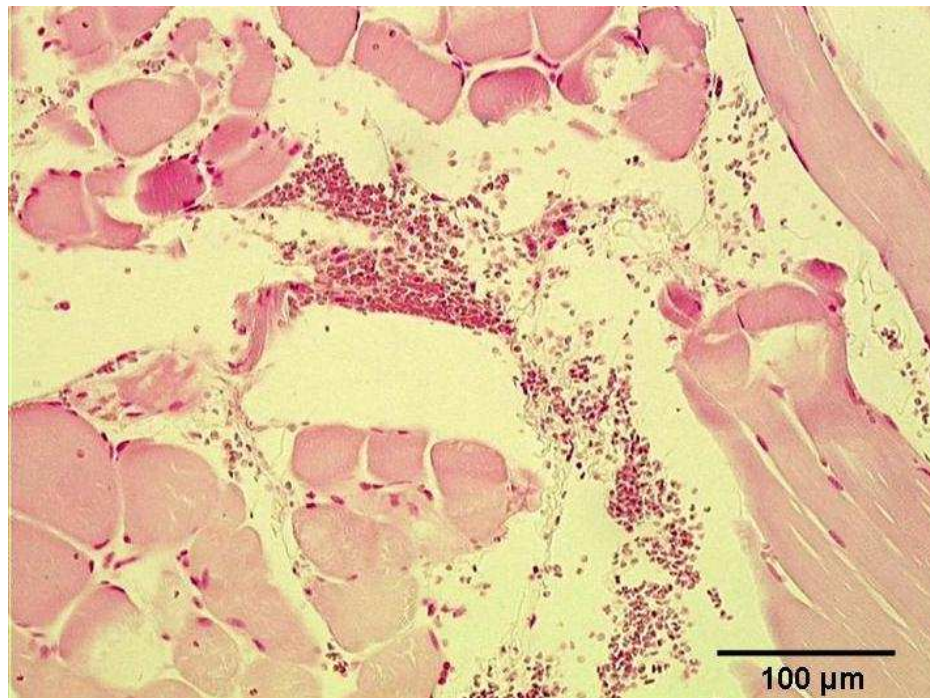
Eine Artefakt-Ausschlusskontrolle wurde mit einer Muskelprobe des M. biventer während der Obduktion an einem Negativkontrolltier durchgeführt. Bei dieser Probe wurde der Muskel mit Hilfe einer Pinzette postmortal stark gequetscht. Diese Probe wies die stärkste Ödembildung auf (siehe Abbildung 14). Der Nachweis von Ödemen in histologisch untersuchten Muskeln wurde daher als Verletzungszeichen ausgeschlossen, da diese postmortal durch die Obduktion entstehen können. Einblutungen, zelluläre Reaktionen und andere Verletzungszeichen konnten in der Artefakt-Ausschlusskontrolle nicht detektiert werden.



**Abbildung 14** H&E-Schnitt der Artefakt-Ausschlusskontrolle des M. biventer ohne Exposition des Tieres mit sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer starken Ödematisierung des Muskelgewebes, festgestellt durch Weitung des interstitiellen Raumes (Vergrößerung 5 x).

Zum weiteren Ausschluss von anderen Verletzungsursachen, die nicht expositionskausal entstanden sind, wie z.B. durch den Transport oder Kampf der Tiere, wurde eine Berliner Blau-Färbung durchgeführt. Diese wurde in Muskelschnitten durchgeführt, bei denen größere Einblutungen befundet wurden (Mulisch 2010). Bei allen gefärbten Muskelproben konnte keine positive Hämosiderin Reaktion festgestellt werden. Hämosiderin kann nach frühestens drei Tagen Post-Trauma in Arealen mit größeren Einblutungen nachgewiesen werden (Schwerd, 1992). In Abbildung 15 ist die Berliner Blau-Färbung einer Muskelprobe des M. splenius mit deutlicher Einblutung in das Interstitium ohne positiven Nachweis von Hämosiderin dargestellt. Vorhandene Einblutungen in Muskelschnitten werden im Folgenden als traumakausal, hervorgerufen durch die Translations-Extensions-Bewegung, gewertet.





**Abbildung 15** Berliner-Blau-Färbung einer Muskelprobe des M. splenius im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Fehlender Nachweis einer Hämosiderin-Reaktion im Einblutungsbereich (Vergrößerung 10 x)

#### 4.2.1.1 Zervikale Muskulatur – HE - Färbung

##### *a) Verletzung I - Einblutungen*

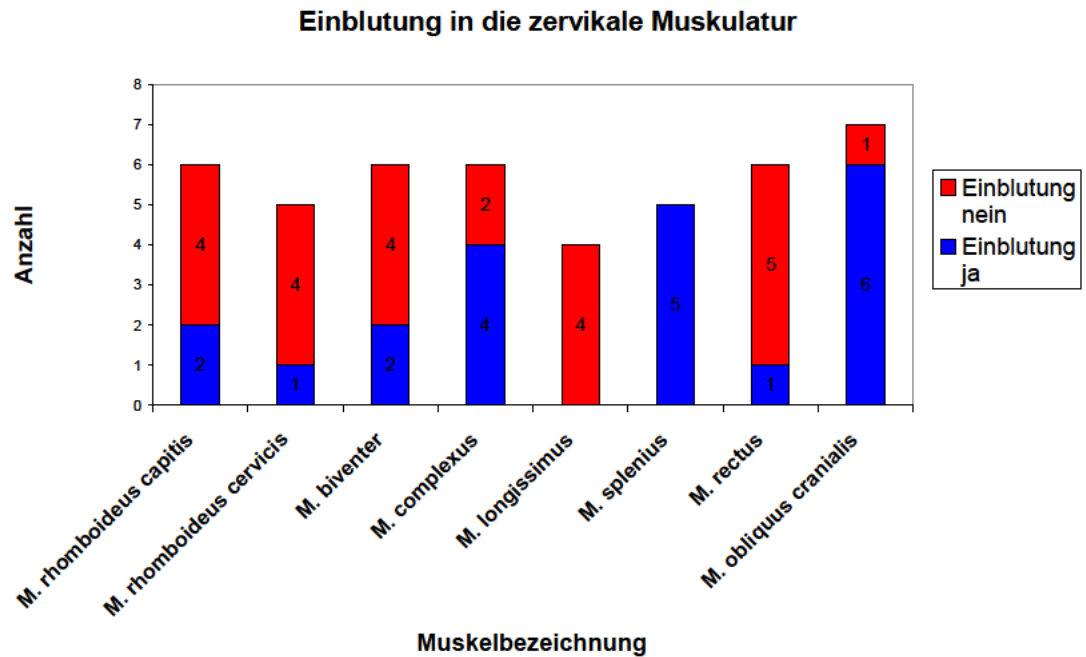
Von insgesamt 45 exponierten Proben aus sieben exponierten Schweinen, wiesen 21 (46,7 %) Einblutungen auf. In 24 (53,3 %) Muskelschnitten konnten keinerlei Einblutungen detektiert werden, respektive befanden sich die Einblutungen ausschließlich im Randbereich oder waren so marginal (wenige einzelne Erythrozyten), dass diese nicht als positive Einblutung gewertet wurden.

Von den 21 positiven Muskelschnitten mit Einblutung zeigte sich bei der Einstufung der Blutungen in fleck- und flächenförmig, dass sieben Muskelproben (33,3 % (7 von 21)) flächenförmige Einblutungen aufwiesen, 12 (57,1 %) fleckförmige Einblutungen und in zwei Fällen (9,5 %) konnten sowohl fleck- als auch flächenförmige Einblutungen nachgewiesen werden.

Bei 16 der 21 Befunde (76,2 %) konnten die Blutungen intramuskulär lokalisiert werden. Interstitielle Einblutungen konnten in fast allen Schnitten nachgewiesen werden (19 von 21). Das Vorkommen von interstitiellen und intramuskulären Einblutungen zusammen wurde in elf Fällen (52,4 %) gefunden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der einzelnen Muskelgruppen konnte festgestellt werden, dass der M. splenius sowie Proben des M. obliquus cranialis am häufigsten Einblutungen aufwiesen. In fünf von fünf Muskelproben des M. splenius wurden deutliche Einblutungen gefunden. Bei den Muskelproben des M. obliquus cranialis wurden in sechs von sieben untersuchten Muskeln Einblutungen befundet. Im Gegensatz dazu konnten bei den vier Muskelproben des M. longissimus keine Einblutungen festgestellt werden. Der M. rectus wies ebenfalls kaum Verletzungszeichen in Bezug auf Einblutungen auf. In einer von sechs Proben konnte eine Einblutung festgestellt werden. Eine Übersicht der Ergebnisse in Bezug auf die Anzahl der Einblutungen der jeweiligen Muskeln ist in Abbildung 16 dargestellt.





**Abbildung 16** Allgemeine Übersicht über die Anzahl der Muskeln mit und ohne Einblutungen

Die quantitative Begutachtung der Einblutungen in den einzelnen Muskelgruppen ergab, dass flächenförmige Einblutung am häufigsten im M. obliquus cranialis auftreten (in fünf von sechs Fällen mit Einblutung). Des Weiteren konnten im M. complexus und M. splenius in jeweils zwei Proben (von vier bzw. fünf Muskelproben mit Einblutung) flächenförmige Einblutungen detektiert werden.

Fleckförmige Einblutungen traten am häufigsten auf. Eine Kombination aus fleck- und flächenförmigen Einblutungen konnte ausschließlich im M. obliquus cranialis (n=2) festgestellt werden. Eine detaillierte Ansicht der einzelnen Muskelgruppen mit der genauen Beschreibung der Einblutung ist in Tabelle 8 gegeben.

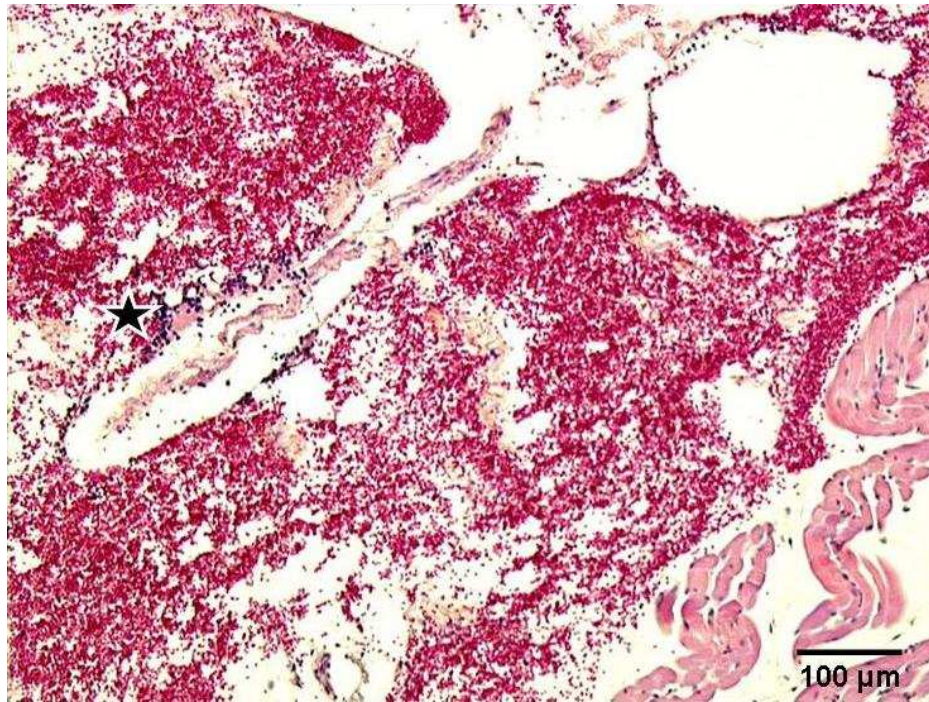
**Tabelle 8** Quantitative Detailauswertung der Muskelpräparate bei welchen Einblutungen befundet wurden

<b>Muskelbezeichnung</b>	<b>Art der Einblutung</b>				<b>Gesamt</b>
	<i>fleck- und flächenförmig</i>	<i>flächenförmig</i>	<i>fleckförmig</i>	<i>keine</i>	
M. rhomboideus capitis	0	0	2	4	6
M. rhomboideus cervicis	0	0	1	4	5
M. biventer	0	0	2	4	6
M. complexus	0	2	2	2	6
M. longissimus	0	0	0	4	4
M. splenius	0	2	3	0	5
M. rectus	0	0	1	5	6
M. obliquus cranialis	2	3	1	1	7

Bei der Befundung der einzelnen Muskelgruppen nach Lokalisation Ihrer Einblutung zeigte sich, dass intramuskuläre Einblutungen hauptsächlich im M. obliquus cranialis auftraten. Auch im M. complexus fanden sich in drei von sechs Schnitten intramuskuläre Einblutungen. Im M. obliquus cranialis konnten in fünf von sechs Schnitten jeweils intramuskuläre und interstitielle Einblutungen befundet werden (Abbildung 17). Eine Übersicht über die Lokalisation der Einblutungen in den jeweiligen Muskeln ist in Tabelle 9 gegeben.

**Tabelle 9** Qualitative Auswertung der Einblutungen mit Angabe der Muskelbezeichnung

<b>Muskelbezeichnung</b>	<b>Lokalisation der Einblutung</b>				<b>Gesamt</b>
	<i>intramuskulär + interstitiell</i>	<i>Nur interstitiell</i>	<i>Nur intramuskulär</i>	<i>keine</i>	
M. rhomboideus capitis	0	0	2	4	6
M. rhomboideus cervicis	1	0	0	4	5
M. biventer	1	0	1	4	6
M. complexus	2	2	0	2	6
M. longissimus	0	0	0	4	4
M. splenius	2	3	0	0	5
M. rectus	1	0	0	5	6
M. obliquus cranialis	5	1	0	1	7

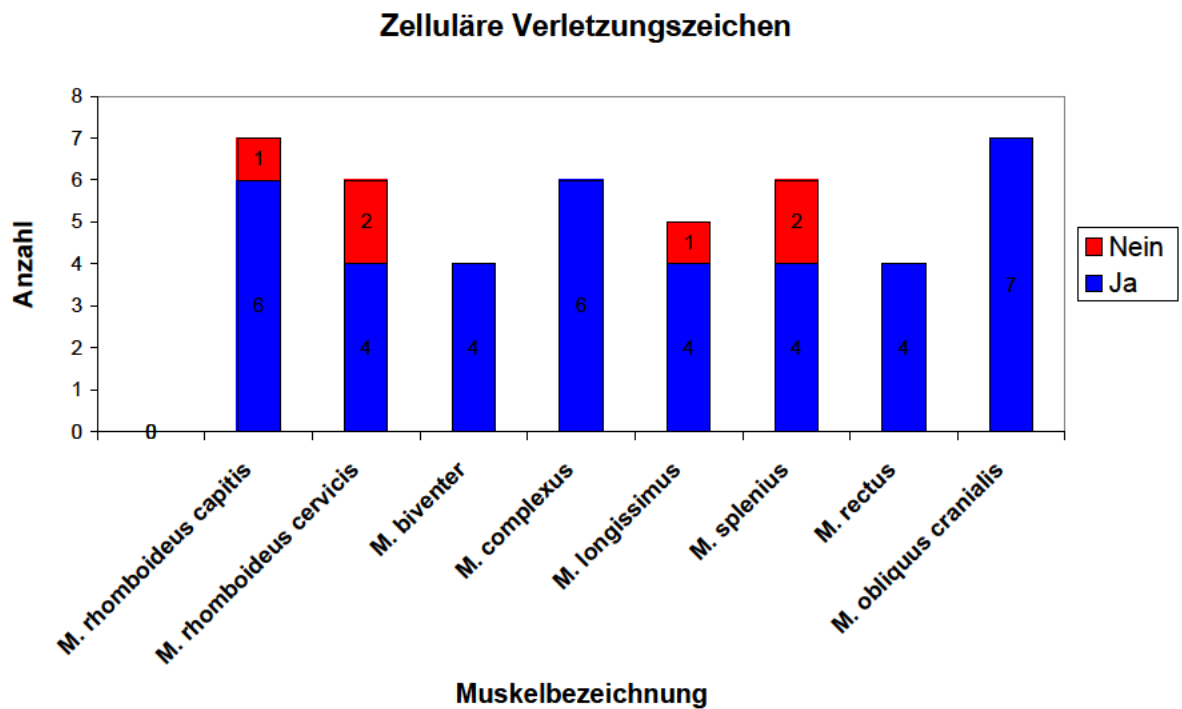


**Abbildung 17** H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. obliquus im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Darstellung einer massiven interstitiellen Einblutung und beginnender leukozytärer Infiltration (Stern) ( Vergrößerung 10 x).

#### ***b) Verletzung II – zelluläre Verletzungszeichen***

Zelluläre Reaktionen konnten in insgesamt 39 von 45 Muskelschnitten (86,7 %) befundet werden. In sechs (13,3 %) Muskelschnitten waren keine zellulären Reaktionen nachweisbar.

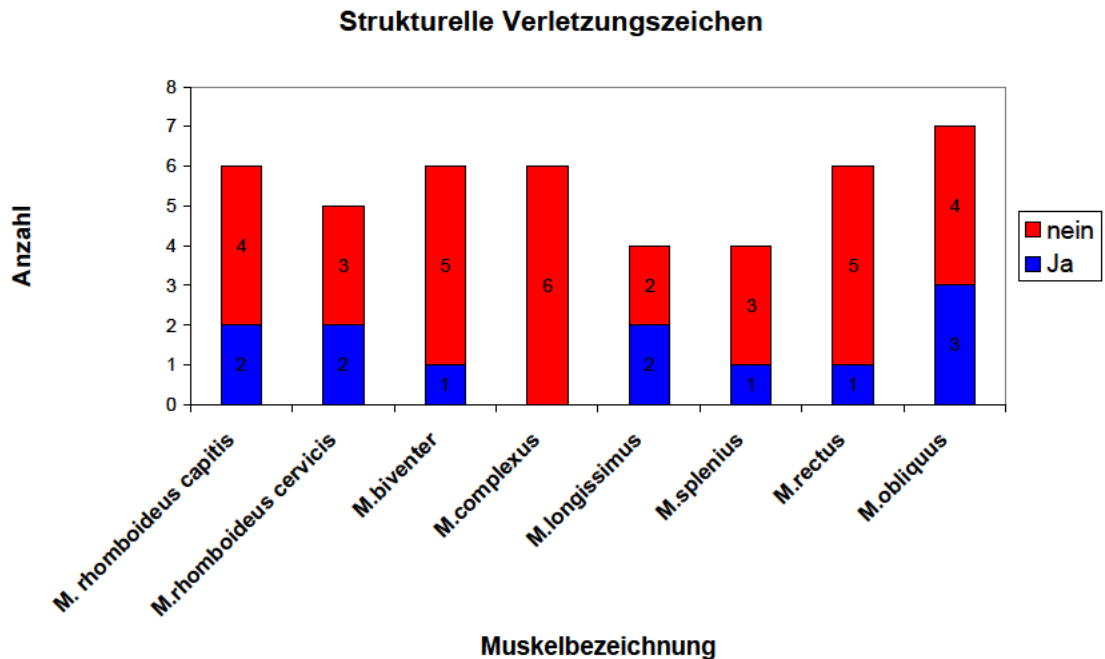
Bei genauerer Betrachtung der zellulären Reaktionen wurde in den meisten Fällen (= 19 von 45; 42,2%) eine leukozytäre Infiltration (neutrophile Granulozyten) befundet. In den anderen Fällen, bei denen eine erhöhte zelluläre Reaktion festgestellt wurde, handelte es sich entweder um Lymphozyten und/ oder um eingewanderte Makrophagen in das Wundgebiet. Abbildung 18 zeigt die Anzahl der detektierten, zellulären Verletzungszeichen in den jeweilig untersuchten Muskeln.



**Abbildung 18** Vorkommen von zellulären Verletzungszeichen in den jeweilig untersuchten Muskeln

### *c) Verletzung III – strukturelle Verletzungszeichen*

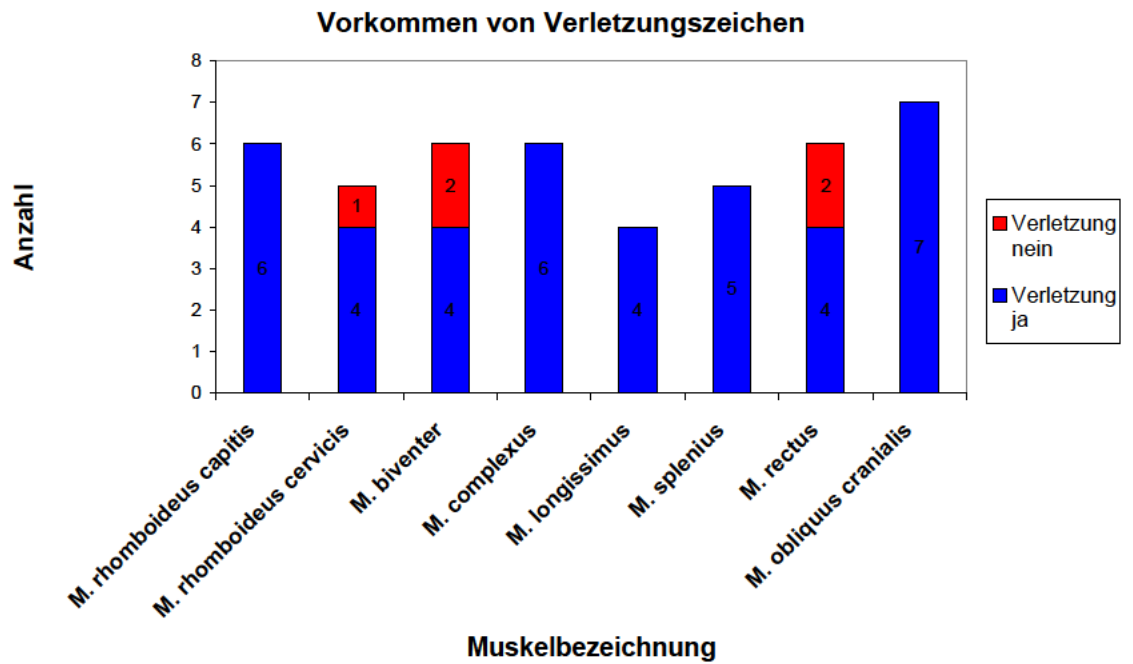
Muskelfaserrisse konnten in insgesamt zwei Muskelproben festgestellt werden, einmal im M. splenius und einmal im M. longissimus. Fasernekrosen konnten in insgesamt zehn Muskelschnitten gefunden werden. Am Häufigsten konnte dies im M. obliquus festgestellt werden (n=3), jeweils zweimal im M. rhomboideus capitis und cervicis und jeweils einmal im M. biventer, M. longissimus und M. rectus. Fasernekrosen waren im M. splenius und M. complexus nicht nachweisbar. Die Fasernekrose wurde bei der Auswertung zu den strukturellen Veränderungen mit einbezogen, da sie u.a. als Folge einer enzymatischen Auflösung von Zell- und Gewebekomponenten auftritt (Böcker et al. 2008). Im M. complexus konnten keinerlei strukturelle Verletzungszeichen nachgewiesen werden. In Abbildung 19 sind die strukturellen Verletzungszeichen zusammengefasst je Muskel dargestellt. Abbildung 21 zeigt einen Nachweis einer lymphozytären Infiltration. Abbildung 22 zeigt einen Faserriss im M. longissimus.



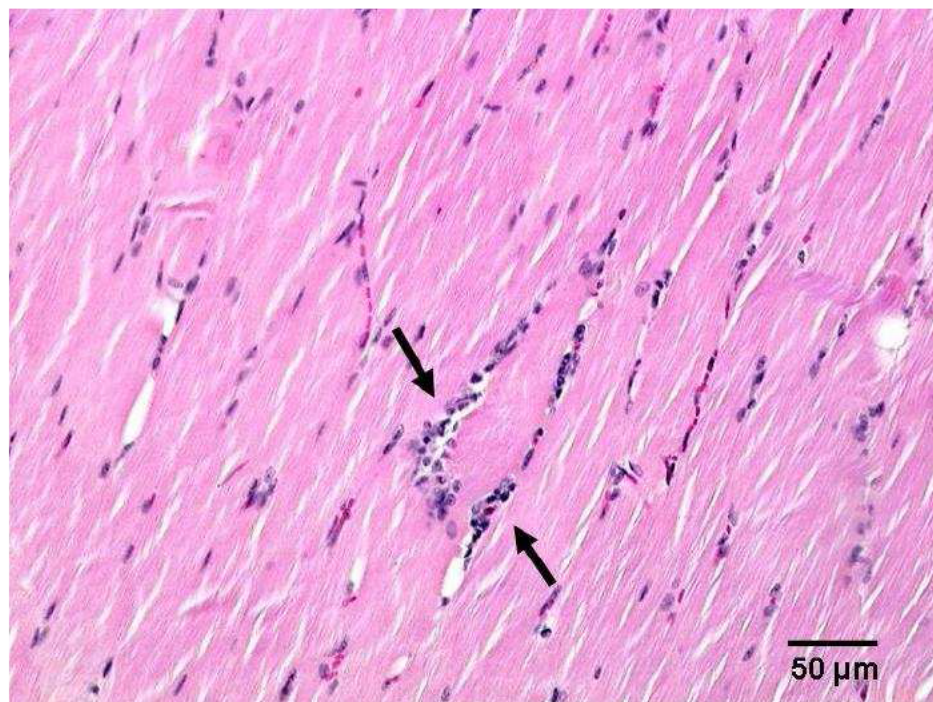
**Abbildung 19** Vorkommen von strukturellen Verletzungszeichen (Faserrisse/ Fasernekrosen) in den jeweilig untersuchten Muskeln

Zusammenfassend zeigte sich, dass es in 88,9 % (40 von 45 analysierten Muskeln) aller untersuchten Muskeln zusammen betrachtet zu Verletzungen nach Exposition der Tiere kam. Bei Betrachtung jedes einzelnen der acht untersuchten Muskeln fanden sich in jeder Muskelprobe des M. rhomboideus capitis, des M. complexus, des M. longissimus, des M. splenius und des M. obliquus cranialis Verletzungszeichen (entweder Einblutung und/ oder zelluläre und/ oder strukturelle Verletzungen). Beim M. rhomboideus cervicis zeigte nur eine von fünf analysierten Proben keinerlei Verletzungszeichen. Beim M. biventer und M. rectus waren es zwei von vier Proben bei denen keinerlei Verletzungszeichen nachweisbar waren. Die graphische Darstellung der Ergebnisse von Verletzungsvorkommen (qualitative Betrachtung) der acht analysierten Muskeln ist in Abbildung 20 gegeben.

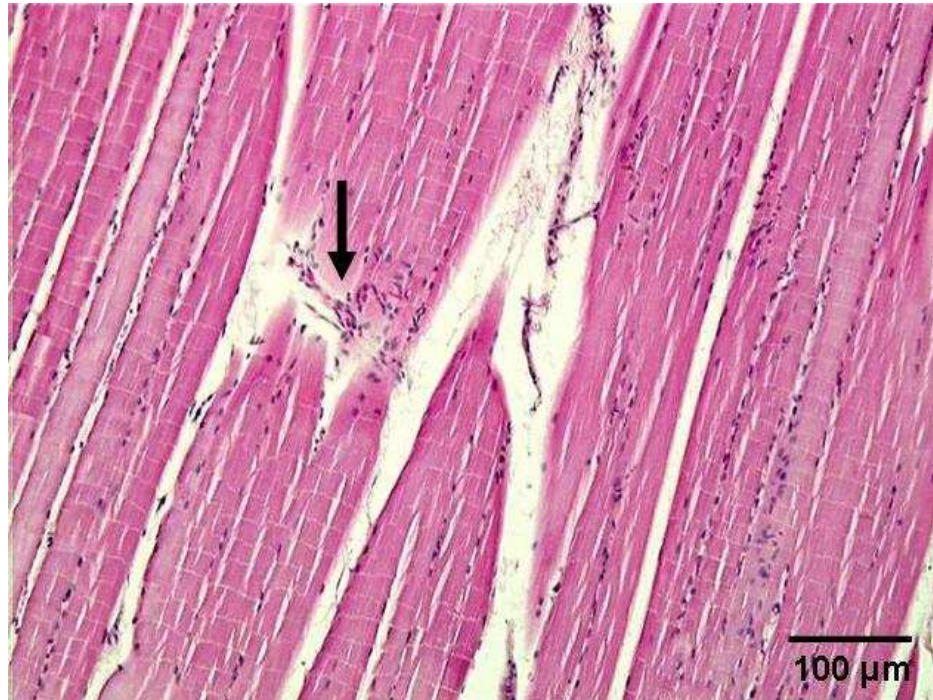




**Abbildung 20** Qualitative Betrachtung von Verletzungsvorkommen wie Einblutungen, zelluläre und strukturelle Verletzungen in den jeweilig untersuchten Muskeln



**Abbildung 21** H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. longissimus nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer lymphozytären Infiltration (Pfeil) Vergrößerung 20 x.



**Abbildung 22** H&E-Schnitt einer Muskelprobe des M. longissimus nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit. Nachweis eines Faserrisses mit beginnender zellulärer Abräumreaktion (Pfeil) (Vergrößerung 10 x).

#### 4.2.1.2 Verletzungshäufigkeit in Abhängigkeit von Überlebenszeit und Exposition

Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Verletzungshäufigkeit (Einblutungen im Muskel und/ oder andere strukturelle und/ oder zelluläre Verletzungszeichen) und der Anzahl der Expositionen (einmalig/ mehrmalig). Da zwischen der Expositionsart (einmalig/mehrmalig) und der Verletzungshäufigkeit kein Zusammenhang besteht, werden einmalig und mehrmalig exponierte Tiere aufgrund der geringen Fallzahl in der Auswertung nicht getrennt voneinander betrachtet.

Es zeigte sich eine Tendenz, dass mit steigender Überlebenszeit mehr Verletzungszeichen nachzuweisen waren. Schweine die nur 4 Stunden überlebten, wiesen 0 bis höchstens 33 % an Einblutungen auf. Bei Schweinen mit einer Überlebenszeit von 6 Stunden lag der prozentuale Anteil von Einblutungen in der Muskulatur pro Schwein zwischen 38 und

71%. Bei einem Tier lag die Überlebenszeit bei 9,5 Stunden. In diesem Tier fanden sich in 89% der Muskeln Einblutungen.

Die qualitative Analyse der Verletzungszeichen pro Schwein, d.h. Vorkommen von zellulären und/ oder strukturellen muskulären Verletzungszeichen, zeigte, dass jedes der exponierten Tiere mindestens eines der Verletzungszeichen aufwies. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse in Abhängigkeit von der Überlebenszeit konnte im Chi2 Test jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen der Verletzungshäufigkeit der Muskulatur pro Schwein und 4, 6 und 9,5 Stunden Überlebenszeit festgestellt werden ( $p=0,358$ ). Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 gegeben.

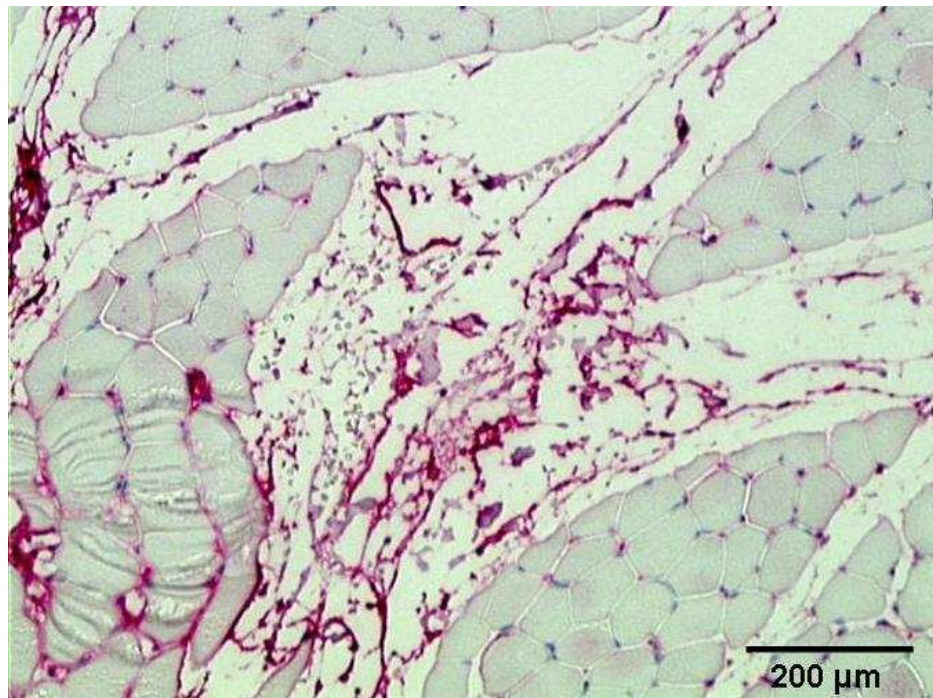
**Tabelle 10** Prozentuales Vorkommen von Verletzungen pro Schwein. Vorkommen von Einblutungen und Befundung allgemeiner Verletzungszeichen (Schwein ID, laut Tabelle 4 und Tabelle 6).

Schwein ID	Anteil [%] von Muskeln mit Einblutungen pro Schwein	Anteil [%] von Muskeln mit allgemeinen Verletzungszeichen pro Schwein
1	0 (n=1)	100 (n=1)
2	25 (n=6)	75 (n=6)
6	33 (n=8)	100 (n=8)
7	38 (n=7)	88 (n=7)
9	71 (n=8)	100 (n=8)
11	38 (n=8)	75 (n=8)
13	86 (n=7)	100 (n=7)

#### 4.2.1.3 Zervikale Muskulatur – Fibronektin-Färbung

Die Fibronektin-Färbung wurde als zusätzlicher Nachweis für die Vitalität der Einblutungen durchgeführt. Eine eindeutig positive Fibronektinreaktion in Form eines typischen Fibronektinnetzwerkes mit einer Vielzahl an Entzündungszellen (Betz 1992), konnte in keinem der untersuchten Schnitte nachgewiesen werden. Abbildung 23 zeigt einen fibronektin gefärbten Schnitt des M. obliquus cranialis mit deutlicher Einblutung in das Interstitium, auch hier ohne eindeutig positive Fibronektinreaktion.





**Abbildung 23** Fibronektin-Färbung einer Muskelprobe des M. obliquus cranialis im Querschnitt nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und vier Stunden Überlebenszeit ohne eindeutige vitale Reaktion im Einblutungsbereich (Vergrößerung 5 x).

#### 4.2.2 Zervikale Facettengelenke

Es wurden insgesamt 29 einzelne Facettengelenke zur histologischen Untersuchung von exponierten Tieren entnommen, 22 der Proben waren nach Entnahme intakt und wurden nach Entkalkung mit 10 % EDTA histologisch analysiert. Sieben Facettengelenke wurden durch die Entnahme beschädigt und wurden von der Analyse ausgeschlossen. Zusätzlich wurde von einem Tier Negativkontrollen (C2/3-C5/6) entnommen und analysiert (n=4). Die Anzahl der Facettengelenksproben mit Angabe der Entnahmehöhe ist in Tabelle 11 angegeben.

**Tabelle 11** Übersicht der Häufigkeiten der histologisch analysierten Facettengelenke in Bezug auf deren Entnahmehöhe und Entnahmeseite (NK = Negativkontrolle; Entnahme rechtsseitig).

Facettengelenkshöhe	Häufigkeit			
	<i>links</i>	<i>rechts</i>	<i>NK</i>	<b>Gesamt</b>
<b>C2/3</b>	3	3	1	7
<b>C3/4</b>	2	4	1	7
<b>C4/5</b>	3	4	1	8
<b>C5/6</b>	1	2	1	4
				<b>26</b>

Zur bilgebenden Untersuchung der Facettengelenke im Phasen-Kontrast-Röntgen wurden zusätzlich von zwei weiteren Tieren rechtsseitig Gelenke entnommen. Schwein Nummer zehn und Schwein Nummer zwölf galten als Negativkontrolle (siehe Tabelle 6). Die insgesamt acht Gelenke (vier exponierte, vier Negativkontrollen) wurden jeweils im Phasen-Kontrast-Röntgen sowie im MRT untersucht. Durch die extra lange und starke Entkalkung konnten die Gelenke nicht histologisch angefärbt werden. Ein Vergleich zur Bildgebung mit der Histologie der Facettengelenke liegt somit nicht vor.

#### **4.2.2.1 Zervikale Facettengelenke – HE-Färbung**

##### ***a) Verletzung I - Einblutungen***

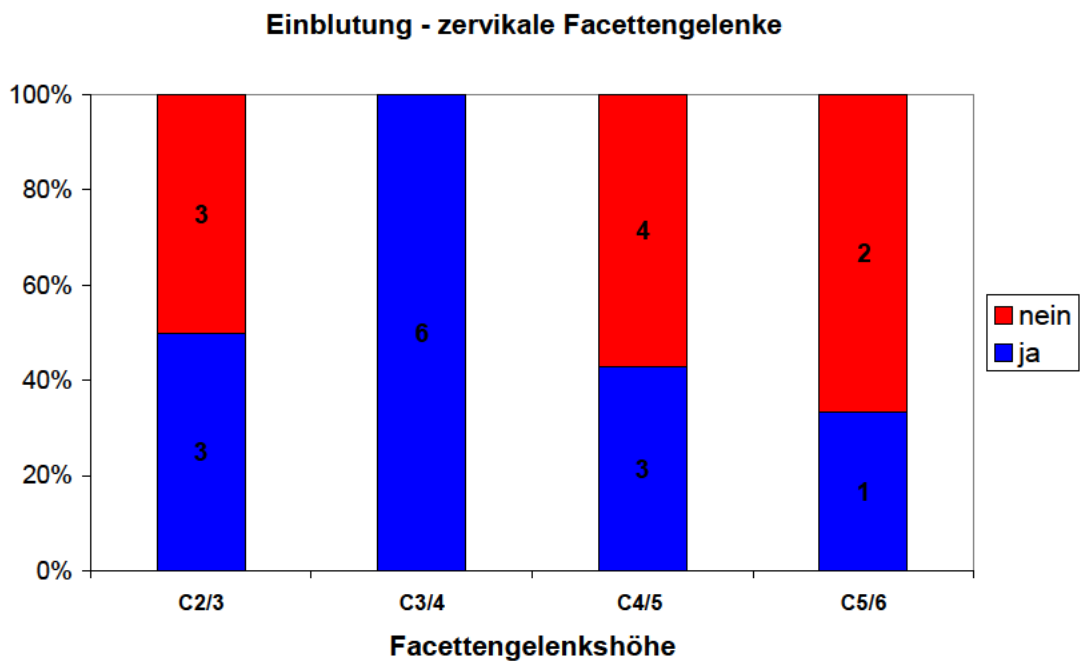
Die meisten Einblutungen fanden sich auf Höhe C3/4, die wenigsten auf Höhe C5/6. Die Einblutungen befanden sich am häufigsten im periostalen Weichgewebe, konnten aber auch im Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefasst und in Abbildung 24 graphisch dargestellt.

In der Negativkontrolle der Facettengelenksprobe Höhe C5/6 wurden ebenfalls Einblutungen in das periostale Weichgewebe befundet. Die Negativkontrollen der Facetten C2/3 bis C4/5 wiesen keinerlei Verletzungen auf.

Die Verletzungen der Facettengelenke sind in den Abbildungen 25 - 29 im histologischen Schnitt dargestellt.

**Tabelle 12** Vorkommen von Einblutungen in Strukturen der Facettengelenke in Bezug auf die Häufigkeiten pro Facettengelenkshöhe bei exponierten Tieren.

Facettengelenkshöhe	Einblutung		Gesamtzahl der entnommenen Facetten
	ja	nein	
<b>C2/3</b>	3	3	6
<b>C3/4</b>	6	0	6
<b>C4/5</b>	3	4	7
<b>C5/6</b>	1	2	3

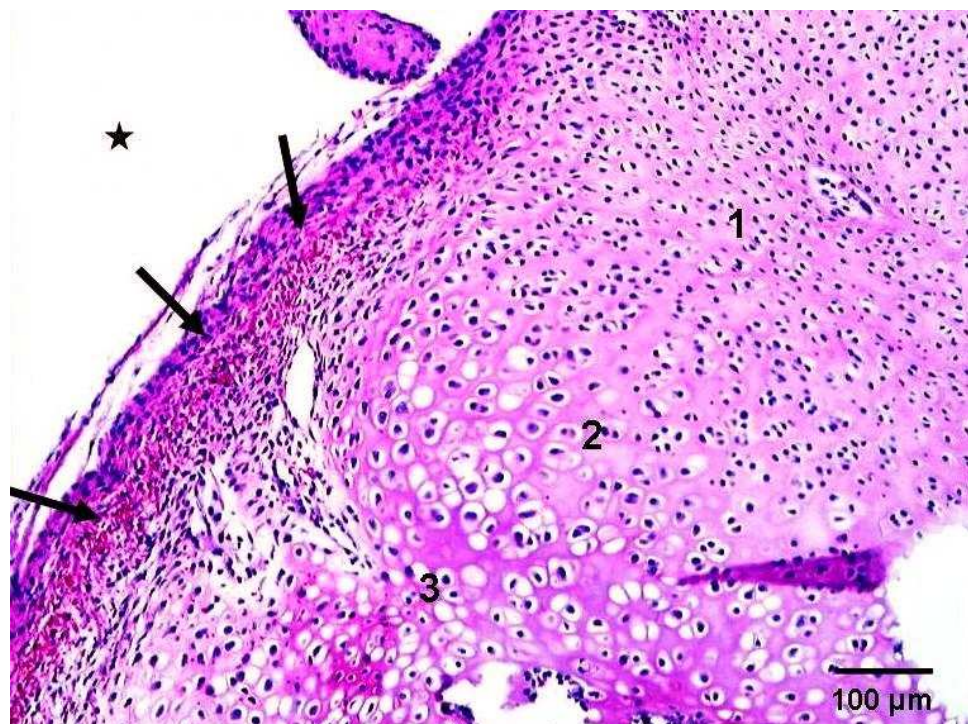


**Abbildung 24** Anzahl der entnommen Facettengelenke nach deren Entnahmehöhe und Häufigkeit von Einblutungen.

Bei Gegenüberstellung der linken und rechten Seite der einzelnen Facettengelenkshöhen zeigte sich auf Höhe C2/3 (66,7%) und C3/4 (66,7%) prozentual kein Unterschied in der Verletzungshäufigkeit. In den tieferen Ebenen auf Höhe C4/5 zeigten sich links (66,7%) mehr Verletzungen als rechts (50%). In C5/6 traten beidseitig zu 100% Verletzungen auf (siehe Tabelle 13).

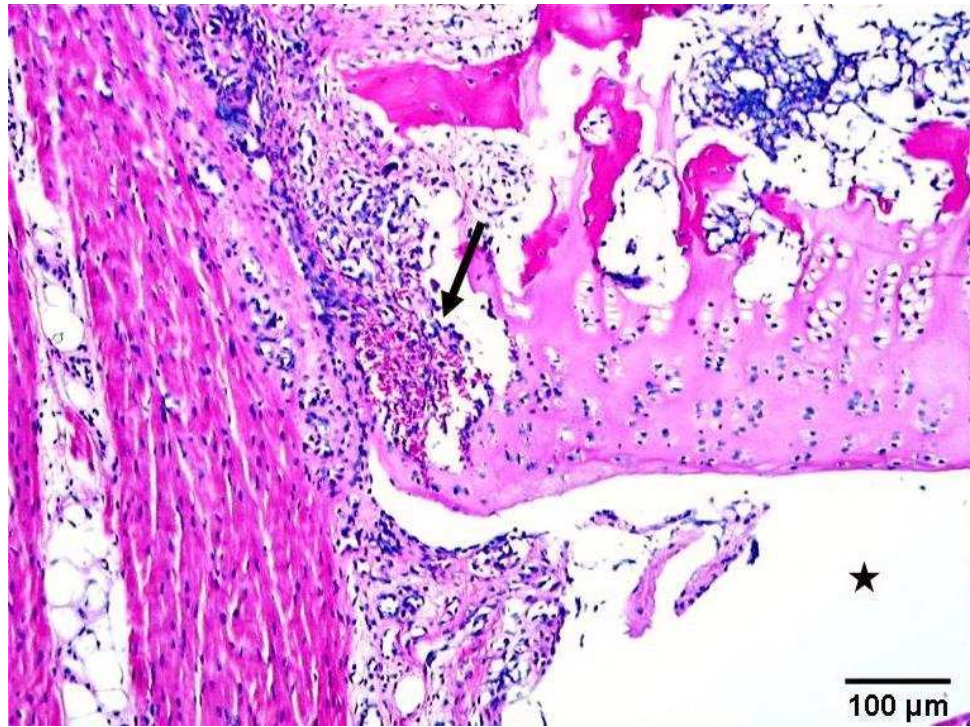
**Tabelle 13** Prozentuales Verletzungsvorkommen in Bezug auf die Facettengelenksseite- und höhe

Facetten Höhe	links			rechts		
	Verletzung	Keine Verletzung	Anzahl der untersuchten Gelenke	Verletzung	Keine Verletzung	Anzahl der untersuchten Gelenke
C2/3	66,7	33,3	3	66,7	33,3	3
C3/4	100,0	0,0	2	100,0	0,0	4
C4/5	66,7	33,3	3	50,0	50,0	4
C5/6	100,0	0,0	1	0,0	100,0	2
Summe	77,8	22,2	9	61,5	38,5	13

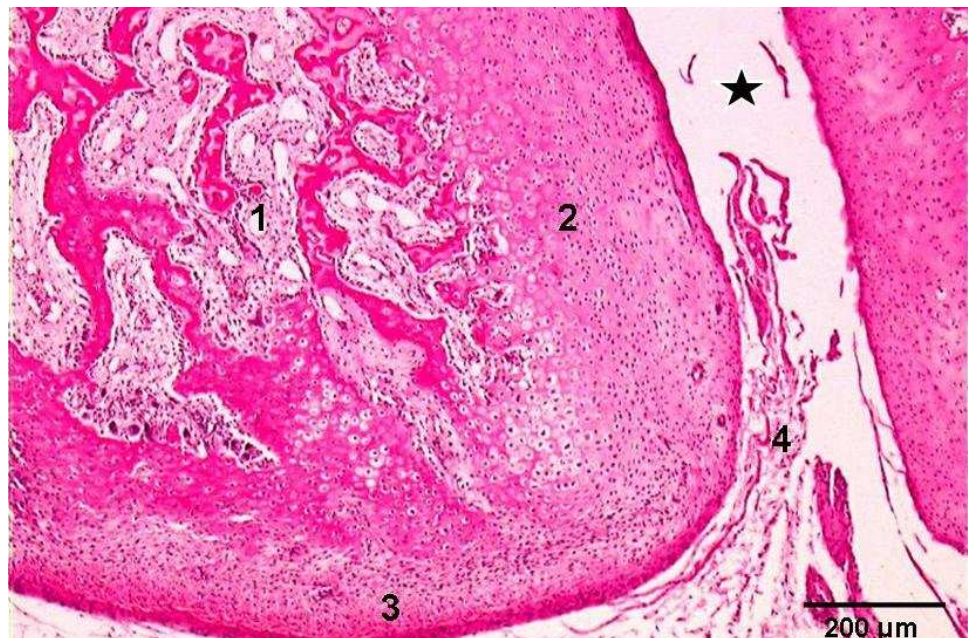


**Abbildung 25** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C2/3 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung im Bereich des Knorpelgewebes, Randbereich des Gelenkes (Pfeil) (Vergrößerung 10 x) (Stern = Gelenkspalt). Darstellung der breiten Knorpelschicht: 1 = hyaliner Knorpel; 2 = Säulenknorpel und 3 = Blasenknorpel.





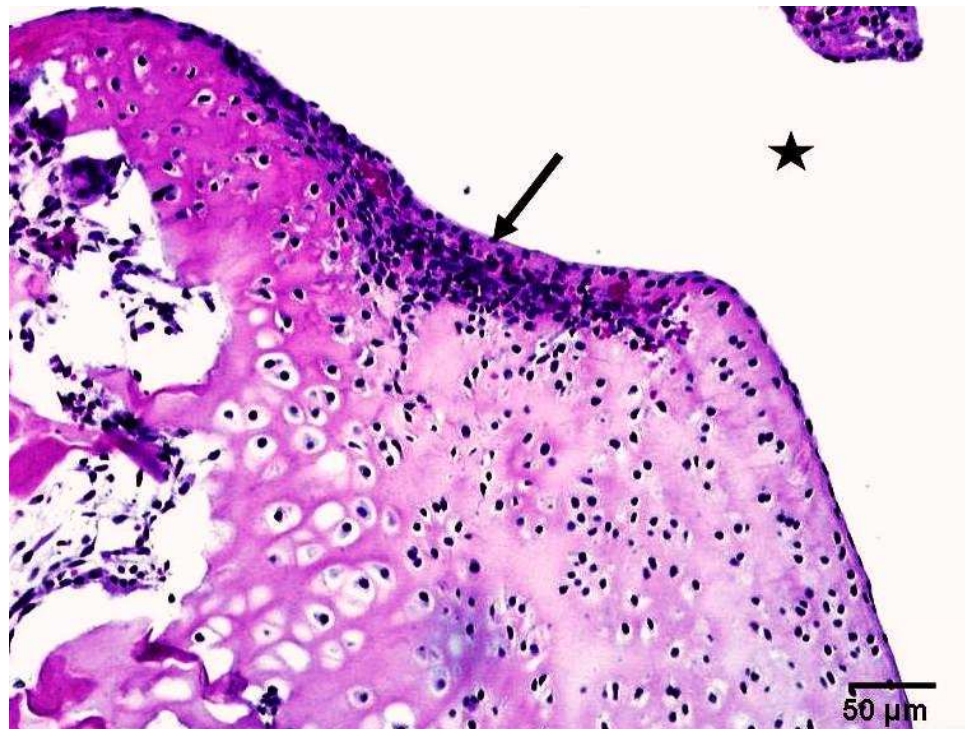
**Abbildung 26** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C2/3 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung in das periostale Weichgewebe (Pfeile) (Vergrößerung 10 x) (Stern = Gelenkspalt).



**Abbildung 27** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C3/4 rechtsseitig. Nachweis eines intakten Facettengelenkes bei einer Negativkontrolle (Vergrößerung 5 x). Darstellung des subchondralen Knochens (1) des Gelenkknorpels (2) der Gelenkkapsel (3) sowie der Synovialzotten (4) und des Gelenkspaltes (Stern).

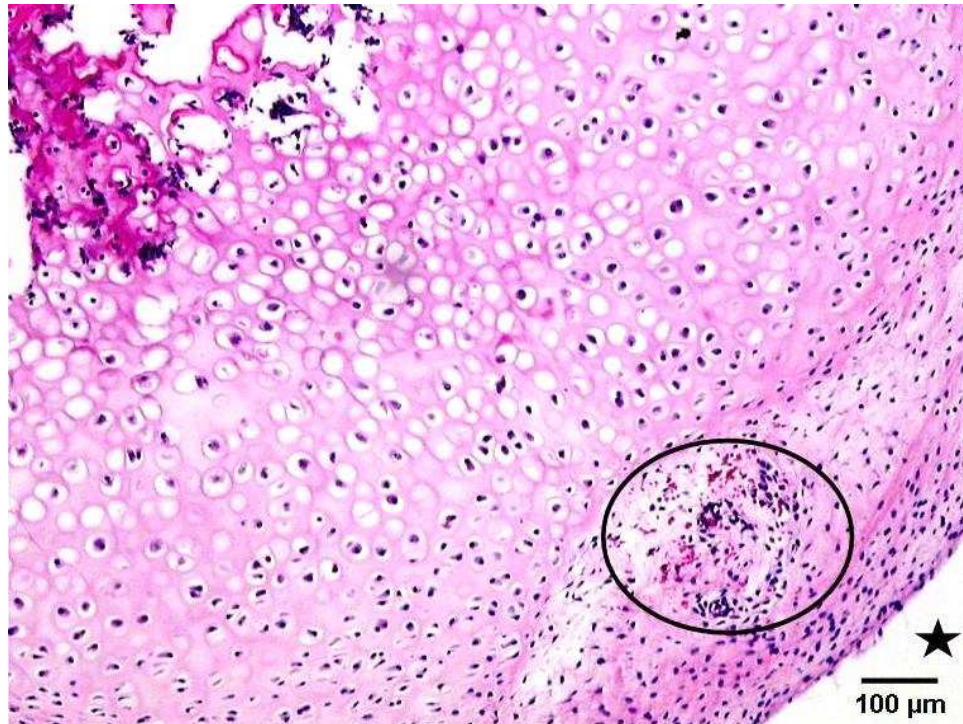
### ***b) Verletzung II – strukturelle/zelluläre Verletzungszeichen***

Bei Befundung der Schnitte auf zelluläre Reaktionen waren in zwei Facettengelenksproben der Höhe C4/5 Exsudate mit deutlicher Infiltration von Makrophagen und Leukozyten darstellbar. In einer einzelnen Facettengelenksprobe der Höhe C2/3 wurden Infiltrationen von neutrophilen Granulozyten befundet. In allen weiteren Proben stellten sich keine gesteigerten zellulären Reaktionen beziehungsweise strukturelle Verletzungen in Form von beispielsweise Zerreißen der Gelenkkapsel oder Strukturverletzungen der Membranen entlang der Gelenkkapsel dar.



**Abbildung 28** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C4/5 linksseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis einer Einblutung in das Knorpelgewebe und Entzündungsreaktion mit Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Makrophagen (Pfeil)(Vergrößerung 20 x) (Stern = Gelenkspalt).





**Abbildung 29** H&E-Färbung: Transversalschnitt durch ein Facettengelenk auf Höhe C4/5 rechtsseitig. Untersuchung nach einmaliger Exposition des Tieres mit einer angelegten Zugkraft von 800 N und sechs Stunden Überlebenszeit. Nachweis wie in Abbildung 28, Verletzung des Knorpelgewebes mit Darstellung von Erythrozyten und Entzündungszellen unter 10-facher Vergrößerung (Stern= Gelenkspalt).

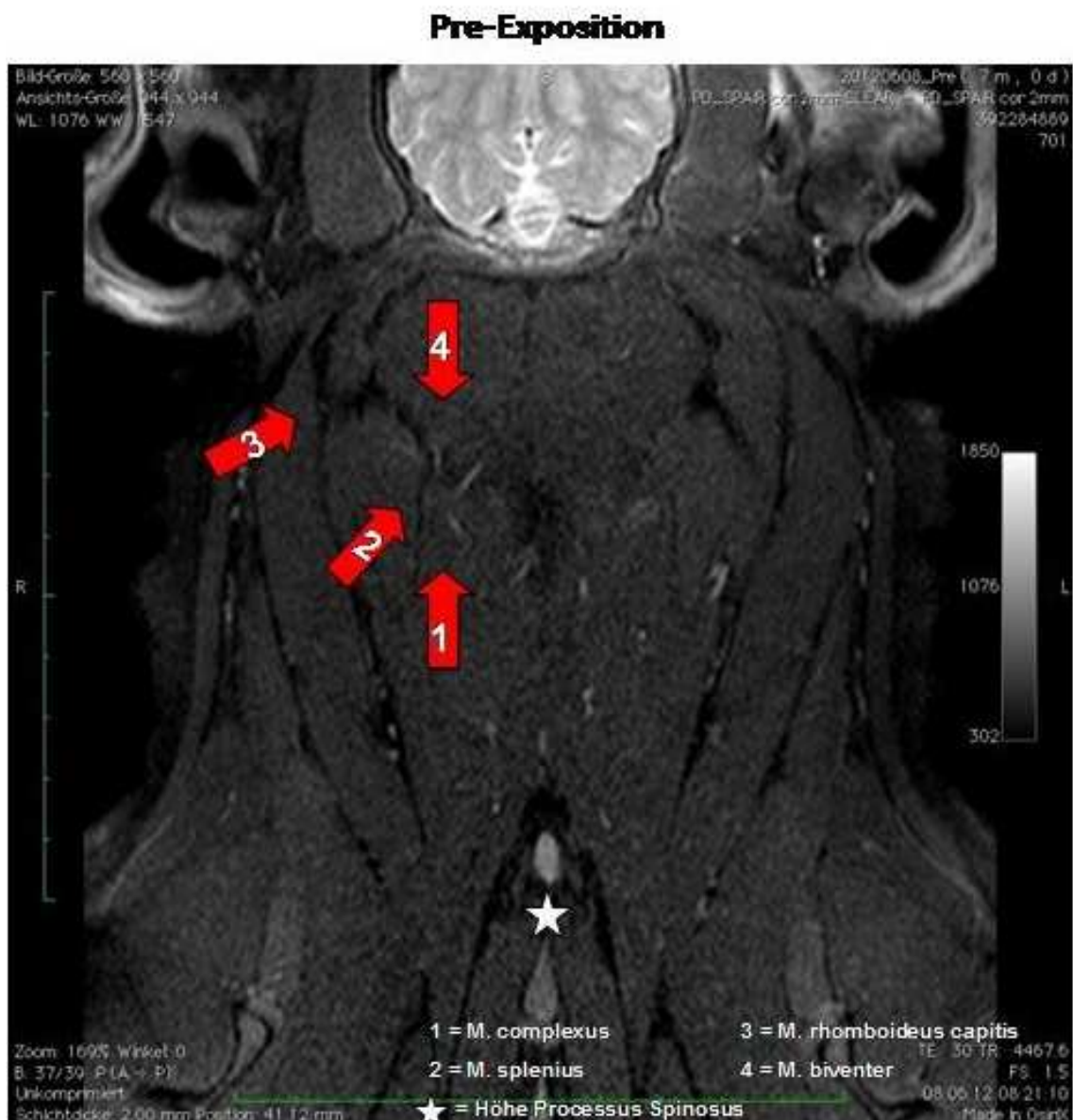
### 4.3 Bildgebung und Histologie der zervikalen Muskulatur

#### 4.3.1 Magnetresonanztomographie – pre-mortale Aufnahmen der zervikalen Muskulatur vor und nach Traumasetzung

Die Betrachtung der MRT-Aufnahmen der HWS-Muskulatur wurde am Versuchstier Nummer 13 vor und nach Traumasetzung durchgeführt. Die Ergebnisse der MRT-Aufnahmen zeigten in der posterioren zervikalen Muskulatur nach dem Trauma (post-Exposition, Abbildungen 31 und 33) im Vergleich zu den Aufnahmen vor Traumasetzung (pre-Exposition, Abbildungen 30 und 32) deutliche Signalanhebungen in der Sequenz T2 STIR. In der Frontalebene zeigten sich post Trauma beidseits deutlich streifige Signalanhebungen im M. complexus sowie im M. splenius, welche sich mit einem posttraumatischem Ödem und/ oder Einblutungen vereinbaren lassen (Abbildung 31). Auch paramedian (links) stellten sich der M. complexus und M. splenius mit deutlich streifigen Signal-

anhebungen post-Exposition dar (Abbildung 33). Bei allgemeiner Betrachtung der MR-Aufnahmen in der zervikalen Region zeigt sich, dass die Nackenmuskulatur in Frontal- und Paramedianebene heller (weniger schwarz) und etwas dicker erscheint.

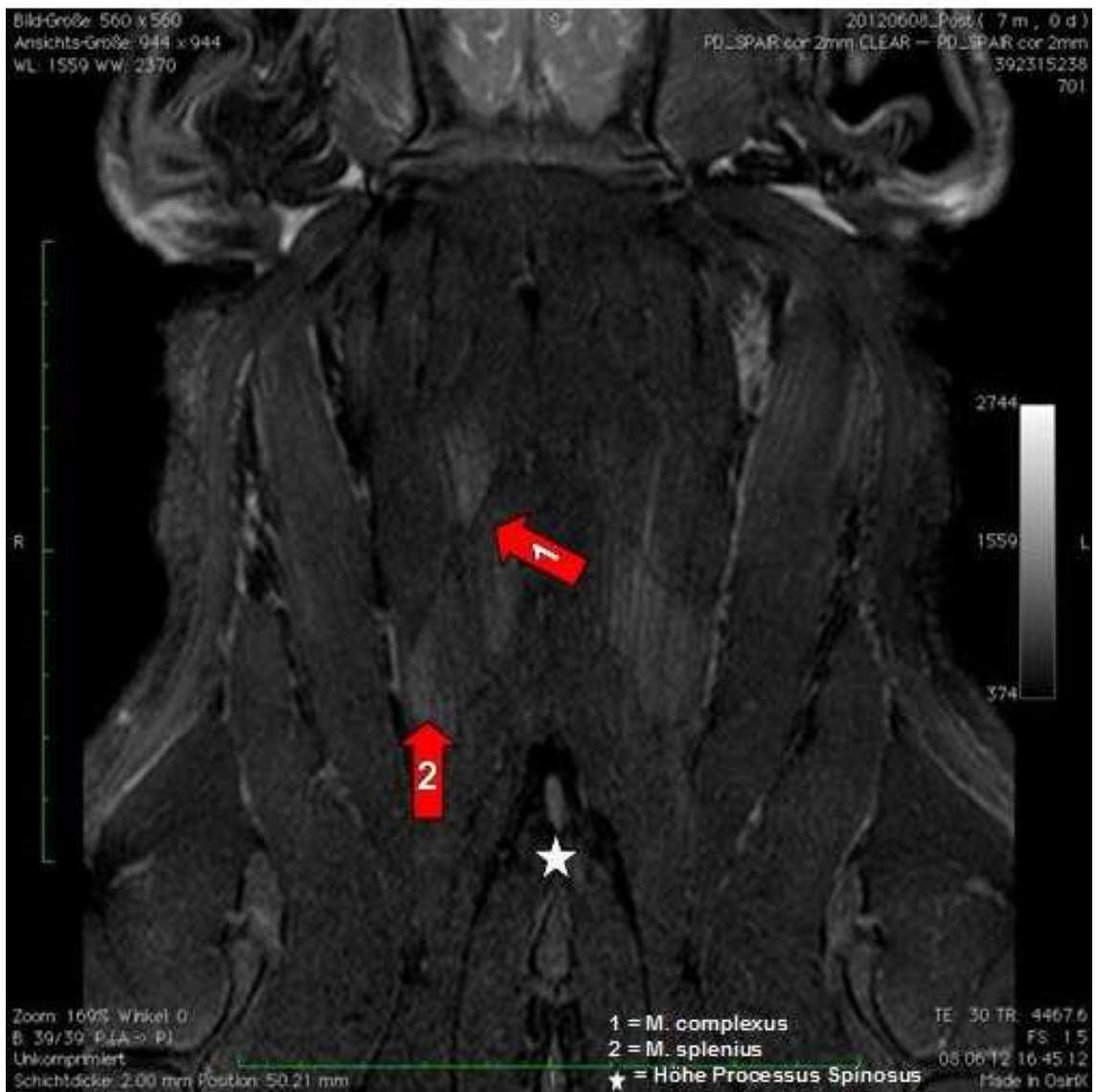
Fokale Läsionen zeigen sich nicht. Die Bandscheiben und Wirbelkörper erschienen unauffällig. Ebenso zeigt das Myelon keine Veränderungen. Die Ergebnisse decken sich mit denen der Obduktion.



**Abbildung 30** MR Aufnahmen des Versuchstieres #13 vor Translations-Extensionstrauma (pre-Exposition); Ansicht in der Frontalebene, Schnitt auf Höhe der Spitze des Processus spinosus von C6 (Stern), mit Markierung der zervikalen Muskeln M. complexus (1), M. splenius (2), M. rhomboideus capitis (3) und M. biventer (4).



## Post-Exposition



**Abbildung 31** MR Aufnahmen des Versuchstieres #13 nach Translations-Extensionstrauma (post-Exposition); Ansicht in der Frontalebene, Schnitt auf Höhe der Spitze des Processus spinosus von C6 (Stern), mit Markierung der Signalanhebungen der zervikalen Muskeln M. complexus (1) und M. splenius (2).



**Abbildung 32** MRT - Aufnahmen des Versuchstieres #13 vor Translations-Extensionstrauma (pre-Exposition); Schnitt in der Sagittalebene paramedian links mit Markierung der zervikalen Muskeln M. complexus und M. splenius.

## Post-Exposition



**Abbildung 33** MRT - Aufnahmen des Versuchstieres #13 nach Translations-Extensionstrauma (post-Exposition); Schnitt in der Sagittalebene paramedian links mit Markierung der Signalanhebungen der zervikalen Muskeln M. complexus und M. splenius.

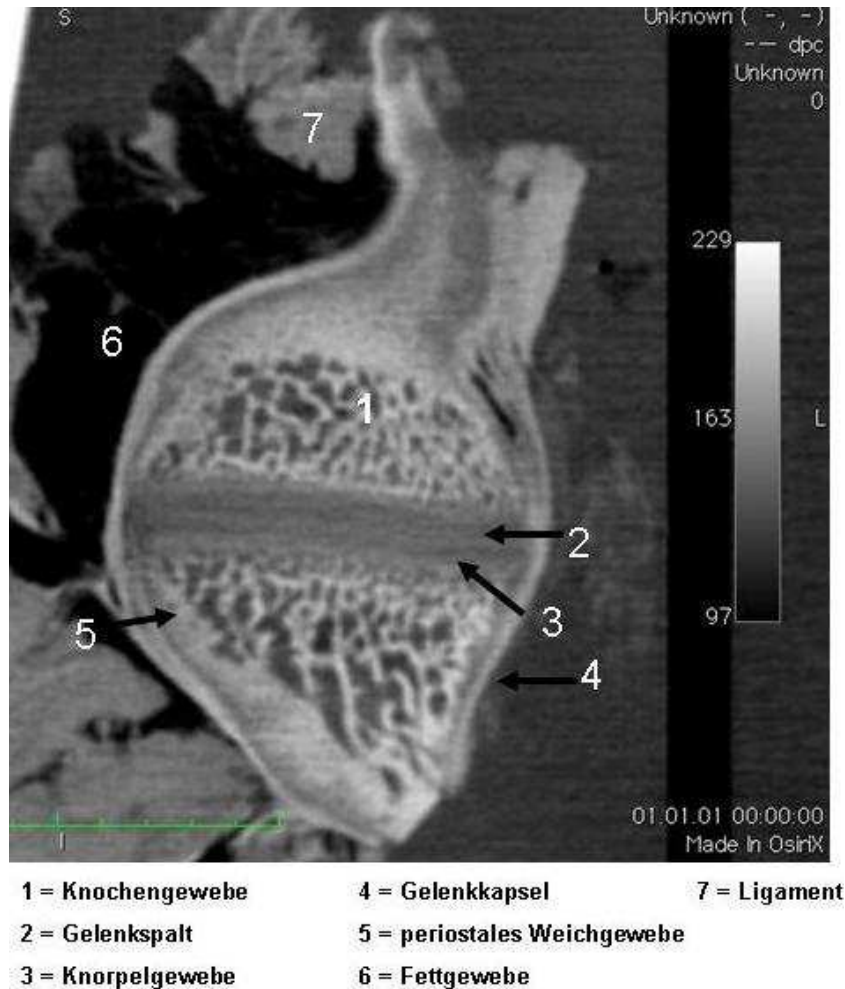
Bei Betrachtung der bildgebenden Verfahren mit der Histologie der zervikalen posterioren Muskulatur des Versuchstieres #13 zeigte sich, dass der M. complexus in der Histologie wie auch im MRT deutliche Einblutungen aufwies. In der HE-Färbung zeigte sich dies in Formung von laminaren, intramuskulären und interstitiellen Einblutungen im M.complexus. In den MRT-Aufnahmen stellte sich dies in der Frontal- wie auch Paramedianebene durch deutliche Signalanhebungen in diesem Muskel dar. Im M. splenius zeigten sich im MRT ebenfalls deutliche Signalanhebungen, welche Einblutungen darstellen. Histologisch konnten auch in diesem Muskel Einblutungen befundet werden, jedoch nicht so eindeutig wie im M.complexus und ausschließlich interstitiell. Was sich in der histologischen

Begutachtung jedoch nicht im MRT darstellte, waren deutliche laminare Einblutungen im M.obliquus, die sich wie im M. complexus interstiell sowie auch intramuskulär deutlich darstellten. Der tiefe M.obliquus lies sich in den MRT-Aufnahmen nicht eindeutig abgrenzen.

## **4.4 Bildgebung der Facettengelenke**

### **4.4.1 Phasen-Kontrast-Röntgen**

Die Untersuchung der Facettengelenke im Phasen-Kontrast-Röntgen zeigte keinen eindeutigen Unterschied zwischen exponierten und nicht-exponierten Proben in diesem bildgebenden Verfahren. Es zeigten sich keine Verletzungen. In Abbildung 34 ist ein Phasen-Kontrast-Bild eines Facettengelenkes der Höhe C3/4 dargestellt. Die einzelnen Gewebe ließen sich mit Hilfe dieser Röntgenmethode sehr gut darstellen. Auch der Gelenkspalt stellt sich mit Hilfe dieser Methode eindeutig dar und hebt sich klar vom Knorpelgewebe ab.



**Abbildung 34** Darstellung eines Facettengelenkes (Höhe C3/4) im Frontalschnitt – Phasen-Kontrast-Röntgen.

#### 4.4.2 Vergleich: Phasen-Kontrast-Röntgen und MRT Aufnahmen im Facettengelenk

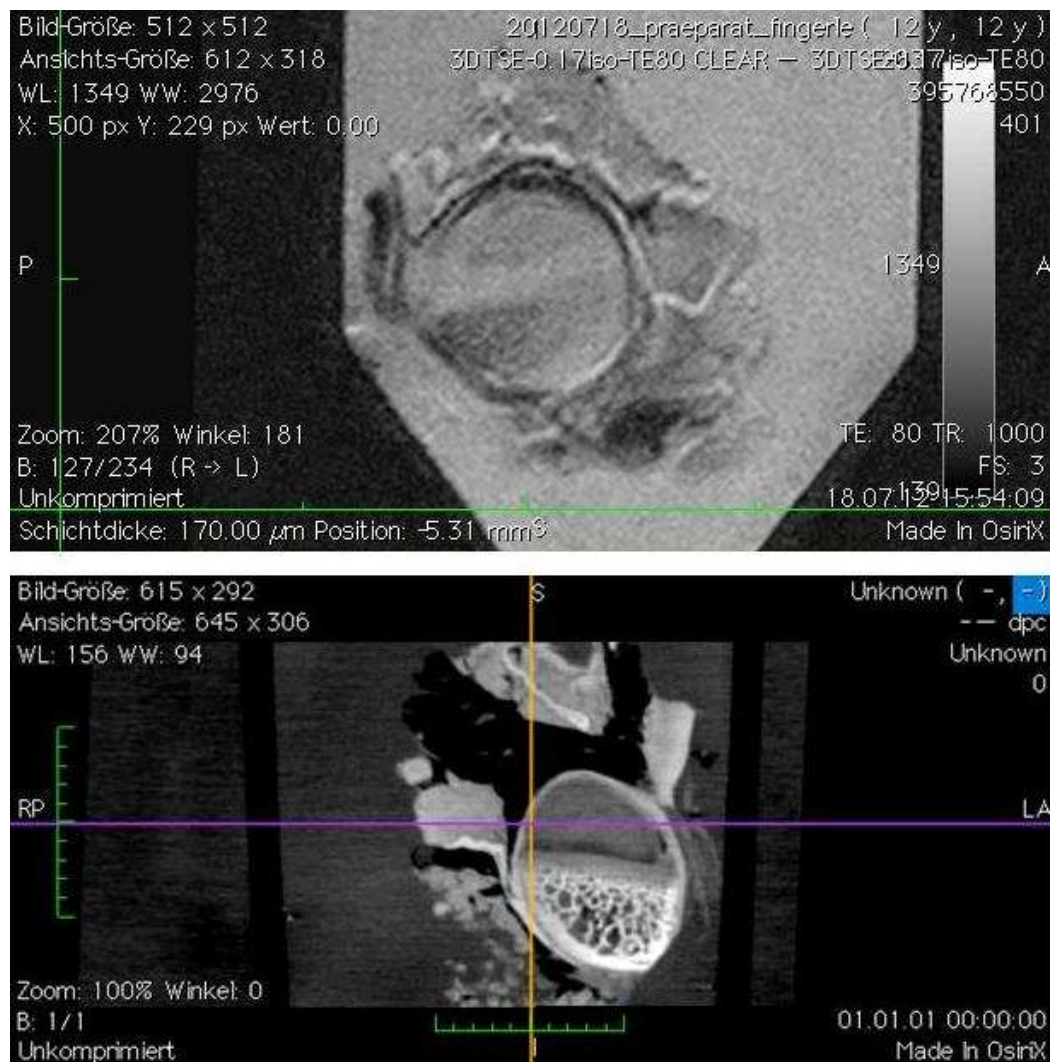
Bei Vergleich von MRT zum Phasen-Kontrast-Röntgen zeigte sich, dass sich im Phasen-Kontrast-Röntgen die einzelnen Gewebsübergänge sehr eindeutig differenzieren lassen. Beispielsweise stellte sich im Gegensatz zu den MRT Aufnahmen der Gelenkspalt wesentlich deutlicher dar. Ebenfalls zeigt sich, der Übergang zum Knorpel-Knochengewebe klarer. Auch die umliegenden Strukturen wie Fett- und Muskelgewebe lassen sich im MRT nicht so eindeutig differenzieren wie im Phasen-Kontrast. Das Phasen-Kontrast-Röntgen überzeugt mit hoher Auflösung der



Aufnahmen, was besonders im direkten Vergleich mit den MRT Aufnahmen in Abbildung 35 deutlich wird.

Es konnten jedoch weder im Phasen-Kontrast-Röntgen noch im MRT Verletzungen befundet werden. Histologische Untersuchungen der vier Facettengelenke von Schwein zehn und zwölf liegen nicht vor und konnten somit nicht zum Vergleich hinzugezogen werden.

Die Dauer der Untersuchung von MRT und Phasen-Kontrast-Röntgen pro Facettengelenk betrugen in beiden Bildgebungsverfahren etwa 20 Stunden um eine deutliche Darstellung der Gewebe zu gewährleisten.



**Abbildung 35** Aufnahmen von Facettengelenken Höhe C4/5 im MRT (oben) und im Phasen-Kontrast-Röntgen (unten).

## **5. Diskussion**

Die Pathophysiologie des Beschwerdebildes der HWS-Distorsion ist noch immer ungeklärt, obwohl schon viele Studien unternommen wurden, um diese noch offene Fragestellung mit Hilfe von u.a. Tiermodellen, Freiwilligenversuchen, PMHS Versuchen oder biomechanischen Menschmodellen aufzuklären. Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zu finden um Verletzungen der posterioren zervikalen Muskulatur und der zervikalen Facettengelenke nach induziertem Translations-Extensions-Trauma unter extrem hoher Energie bei Schweinen histologisch nachzuweisen. Nach aktuellem Wissensstand ist diese Arbeit die Erste, die sich im Schweinemodell auf die mikroskopische Auswertung zervikaler Muskeln (oberflächlich bis tief) konzentriert hat, zusätzlich Serummarker analysiert hat und auch gleichzeitig Facettengelenke dieser Spezies histologisch wie auch mit bildgebenden Verfahren untersucht hat.

### **5.1 Verletzungsdetektion - zervikale Muskulatur**

Insgesamt wurden 45 Muskeln aus sieben exponierten Schweinen und sieben Muskeln von einem Negativkontrolltier entnommen (siehe Tabelle 7). Die unterschiedlichen Anzahlen der einzelnen Muskeln wie sie in den Ergebnistabellen dargestellt sind, ergeben sich dadurch, dass sich gerade die lateral gelegenen Muskeln nicht immer klar voneinander differenzieren ließen und somit teilweise nicht entnommen werden konnten. Dies zeigte sich vorallem beim M. longissimus und M. splenius, die sich als schwer differenzierbar darstellten. Als einfach differenzierbar zeigten sich die oberflächlichen Muskeln, der M. rhomboideus capitis und cervicis, sowie die tiefsten Muskeln wie der M. rectus und M. obliquus cranialis. Primär wurden die zervikalen Muskeln mit standard-histologischen Färbungen auf Einblutungen und zelluläre Reaktionen (e.g. Infiltration von Granulozyten) untersucht.

Zusätzlich wurden Myoglobin und CK-MM Analysen im Serum untersucht, mit welchen ebenfalls Verletzungen der Muskulatur analysiert werden können.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Serummarker und der histologischen Analysen diskutiert.

### **5.1.1 Serummarker**

Das Serum der Versuchstiere wurde auf erhöhte Kreatinkinase- (CK-MM) und Myoglobin-Werte getestet um eine Verletzung in der Skelettmuskulatur nachzuweisen, hervorgerufen durch die induzierte Translations-Extensions-Bewegung. Laut einer Studie, bei der die Kreatinkinase-Werte von Probanden untersucht wurden, die klinisch eine HWS-Distorsion erlitten, konnte festgestellt werden, dass dieser Serummarker einen sensitiven Indikator für Skelettmuskelverletzungen repräsentiert (Scott and Sanderson, 2002). Daher wurde dieser Marker auch in vorliegender Studie zur Untersuchung von Verletzungen der zervikalen Muskulatur verwendet. Bei Betrachtung vorliegender Ergebnisse der CK-MM Analysen zeigte sich, dass die Enzymaktivität der exponierten Tiere vor allem in der ersten halben Stunde stark anstieg. Die Enzymaktivität stieg bei den Negativkontrolltieren ebenfalls innerhalb der ersten halben Stunde an, jedoch in einem viel geringeren Ausmaß. Der Anstieg bei der Negativkontrolle lässt sich dadurch erklären, dass bei der Präparation der einzelnen Zugänge und bei Zugangslegung der externen Trachealkanülen auch kleinere Verletzungen an naheliegenden Muskeln auftreten konnten, was wiederum zu einem Anstieg der CK-MM führen kann.

Es zeigte sich in verschiedenen Studien, dass sich der Maximalwert der CK nach Verletzungen zwischen 24 und 48 Stunden befindet (Konikoff et al., 1985, Oni et al., 1989; Swain et al., 1990), was sich in unserer Studie nicht zeigte. Es stellte sich deutlich dar, dass sich der Maximalwert bei den exponierten Tieren innerhalb der ersten zwei Stunden befand, danach sank der Wert wieder ab. Es bleibt spekulativ, wie sich der Verlauf in den folgenden 48 Stunden entwickelt hätte und ob es zu einen erneuten Anstieg gekommen wäre.



Ein erhöhter CK-Wert kann auf der einen Seite eine Muskelschädigung als Ursache haben, kann jedoch auch durch Stress wie in unserem Fall zum Beispiel durch den Transport der Tiere, die Umstallung oder auch durch die Gabe der kurzen Allgemeinanästhesie in den Stallungen entstehen (Lengerken 1977). Dies würde auch den schnellen Anstieg der CK erklären, der sich in den ersten zwei Stunden nach Gabe der Allgemeinanästhesie zeigt, also 30 Minuten nach der ersten Exposition. In einer Dissertationsarbeit aus der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München wurden Untersuchungen verschiedener biochemischer Parameter bei unterschiedlichen Schweinerassen durchgeführt, dort zeigte sich, dass die CK-Normwerte zum einen rassenabhängig sind und dass der Bereich zwischen Minimum- und Maximumwerten sehr weitläufig ist. So wurde bei Betrachtung der belgischen Landrasse gezeigt dass diese allgemein sehr hohe CK Aktivitäten aufweist (Maximalwert 1066 U/L). In dieser Studie konnten Werte zwischen 400 und 1860 U/L (Ausreisser Negativkontrolle) festgestellt werden, die sich auch in der Dissertationsarbeit von Kixmüller (2004) zeigte. Ein Negativkontrolltier (WL 11-13) zeigte von Anfang an eine starke Enzymaktivität im Vergleich zu den anderen Tieren, bei welchem ebenfalls eine starke Herzhypertrophie aufgrund der Belastungssituation beobachtet werden konnte. Werte für die CK-Normwerte der Schwedischen Landrasse lagen uns nicht vor. Es konnte trotzdem ein deutlicher Anstieg der Enzymaktivität bei den exponierten Tieren im Vergleich zu den nicht-exponierten Tieren im Bezug auf den Ausgangswert festgestellt werden, was darauf hinweist jedoch nicht beweist, dass eine Verletzung durch das induzierte Translations-Extensions-Trauma bei unseren Versuchstieren vorlag. Des Weiteren müssten noch andere Verletzungsmarker getestet werden, um den Verdacht einer muskulären Verletzung zu bestätigen. Diese Marker konnten für Schweine in der klinischen Chemie nicht untersucht werden, da nur wenige dieser Marker für Schweineserum geeignet waren.

Als weiterer Marker zur Untersuchung von Skelettmuskelschädigungen wurde das Muskelprotein Myoglobin im Serum untersucht. Dieser Marker hat seinen Peak, genauso wie die Kreatinkinase, innerhalb der ersten

zehn Stunden post-Trauma und zählt zu den Standardmarkern um muskuläre Verletzungen zu untersuchen. Da die längste Überlebenszeit der Tier post Trauma in vorliegender Studie maximal 9,5 Stunden betrug, wurden Marker gewählt die innerhalb kürzester Zeit nachweisbar sind und deren Peak in dem Überlebenszeitraum der Versuchstiere lag. Bei Auswertung der Ergebnisse zeigte sich, dass die Untersuchung des Myoglobinmarkers im Schweineserum nicht funktionierte und lediglich eine Fehlermeldung produzierte. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Schweine aufgrund Ihrer Umzüchtung für die Fleischproduktion hauptsächlich weiße Muskelfasern des Typs II-b (bis zu 70%) enthalten, welche wiederum einen sehr geringen Anteil an Myoglobin besitzen (Plonait, 2004). Myoglobin steigt innerhalb der ersten 1,5 bis 2,5 h nach Muskelverletzung an, seinen Peakwert hat es etwa nach 8 Stunden. Unsere Schweine überlebten vier beziehungsweise sechs Stunden nach dem Verletzungsereignis. Man hatte also zumindest einen leichten Anstieg des Myoglobins erwartet. Bei Skelettmuskelverletzungen ist aber die Kreatinkinase für die Bestimmung der Verletzung spezifischer als die des Myoglobins. Myoglobin wird hauptsächlich bei der Herzinfarktdiagnostik eingesetzt (Gürkov 2010).

### **5.1.2. Histologische Auswertung**

Bei der Präparation der zervikalen Muskeln, wurden direkt aus dem Schwein etwa 3 x 1 cm große Proben entnommen und dann im Labor auf eine Größe von 1 x 0,5 x 0,5 cm zugeschnitten und histologisch untersucht. Bei der Befundung der HE-Färbung stellte sich heraus, dass fast in der Hälfte der untersuchten Muskeln Einblutungen zu sehen waren (47 %; n= 21). Bei der detaillierten Auswertung zeigte sich, dass die stärksten und häufigsten Einblutungen im oberflächlichen spino-transversal orientierten Musculus splenius capitis und im tiefen Musculus obliquus capitis cranialis auftraten. Der M. splenius wie auch der M. obliquus repräsentieren zwei wichtige und vor allem kräftige Muskeln. Der M. obliquus dient der Aufrechterhaltung des Kopfes und der M. splenius hat die Aufgabe den Hals zu strecken und/ oder den Kopf anzuheben. Der M. splenius ist gerade bei männlichen Individuen stark

ausgeprägt, da er die Grundlage des sogenannten „Stiernackens“ bildet. Warum gerade diese beiden Muskeln die meisten Verletzungen aufwiesen, ist bisher unklar, da diese weder die gleiche Orientierung noch Lage aufweisen. Der M. splenius gehört zum spinotransversalen System und der M. obliquus gehört zur tiefen Nackenmuskulatur. Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass durch die induzierte Translations-Extensionsbewegung und die fehlende Muskelreaktion durch die Anästhesie alle zervikalen Muskeln gleichermaßen belastet werden.

Im M. complexus zeigten sich ebenfalls in vier von sechs Muskelproben Einblutungen. Dieser Muskel repräsentiert im Schwein zusammen mit dem M. biventer cervicis den M. semispinalis capitis. Der M. semispinalis capitis steht in engem Kontakt zum M. splenius.

In diesen beiden Muskeln waren histologisch wie auch im MRT Verletzungen nachweisbar. Die wenigsten Verletzungen in Bezug auf Einblutungen zeigten sich im M. longissimus und M. rectus. Diese beiden Muskeln stehen anatomisch gesehen in keinem direkten Zusammenhang, da sie zu unterschiedlichen Muskelgruppen mit unterschiedlicher Orientierung gehören. Bei Betrachtung der Funktion dieser beiden Muskeln fällt jedoch auf, dass der große Musculus longissimus capitis sowie auch der kleine M. rectus capitis dorsalis major beide u.a. für die Seitwärtsneigung und/ oder Dorsalflexion des Kopfes zuständig sind. Wie dies jedoch in Zusammenhang mit der Verletzungsneigung steht, bleibt spekulativ.

Die häufigsten intramuskulären Einblutungen zeigten sich im M. complexus und M. obliquus capitis cranialis. Diese beiden Muskeln wiesen jedoch auch gleichzeitig interstitielle Einblutungen auf. Der M. splenius zeigte histologisch hauptsächlich interstitielle Einblutungen. Auch in der Bildgebung zeigten sich Hinweise auf Verletzungen im M. splenius sowie auch im M. complexus in Form von Ödematisierung und/ oder Einblutungen. Jedoch konnten in der Bildgebung keine Verletzungen im M. obliquus dargestellt werden. Da aber nur von einem Schwein MRT-Aufnahmen vorlagen, gestaltet es sich schwierig, eindeutige Aussagen bezüglich der allgemeinen Verletzungslokalisation

zu machen. Bei der quantitativen histologischen Auswertung der Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass ausschließlich der M. complexus, der M. splenius und der M. obliquus capitis cranialis flächenförmige, also großflächige Einblutungen aufwiesen. In den anderen Muskeln konnten nur fleckförmige, also kleinflächige Einblutungen gefunden werden. Bei Befundung der Schnitte auf zelluläre Reaktionen, konnte festgestellt werden, dass in fast 90% aller untersuchten Muskelproben zelluläre Reaktion auftraten, bei denen es sich hauptsächlich um leukozytäre Infiltrationen durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen handelte. Neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen infiltrieren nach einer Verletzung des Gewebes schon sehr schnell das Wundgebiet. Die früheste Nachweisbarkeit von neutrophilen Granulozyten liegt etwa bei 15-30 Minuten nach Wundsetzung. Die Wanderungsgeschwindigkeit von Makrophagen ist etwas langsamer, diese lassen sich frühestens nach etwa 3 Stunden post Trauma nachweisen (Betz, 1999). Da die Schweine in vorliegender Arbeit zwischen vier und sechs Stunden, einmalig neun-einhalb Stunden, überlebt haben, können diese Entzündungszellen mit Sicherheit nachgewiesen werden. Es muss jedoch beachtet werden, dass Granulozyten auch passiv im Rahmen einer Einblutung in das Gewebe mit eingeschwemmt werden können, daher sind laut Betz (1999) nur jene Entzündungsreaktionen als eindeutig positiv zu bewerten, bei welchen auch Granulozyten außerhalb des direkten Blutungsareals nachzuweisen sind. In den histologischen Schnitten dieser Arbeit konnten Entzündungszellen auch abseits der Einblutungsareale festgestellt werden. Eine frische Entzündungsreaktion, wie sie sich in den untersuchten histologischen Schnitten darstellt, ist ein deutlicher Hinweis auf eine vitale Reaktion. Man kann darauf schließen, dass die Einblutungen prä-mortal und nicht post-mortal entstanden sind (Betz, 1999). Ein weiterer Nachweis für die Vitalität der Einblutungen in den exponierten Muskelproben zeigt sich darin, dass in allen Negativkontrollen keinerlei Einblutungen nachweisbar waren. Es kann dadurch ausgeschlossen werden, dass die Einblutungen durch die Obduktion entstanden sind. Als postmortales Verletzungszeichen kann jedoch der Nachweis von Ödemen in den histologischen Schnitten

gewertet werden, da diese nicht nur in den exponierten Proben sondern auch in der Negativkontrolle und vor allem in der Artefakt-Ausschlusskontrolle gefunden wurden. Die Artefakt-Ausschlusskontroll - probe wurde bei der Entnahme (post-mortal) extra stark mit Hilfe einer Pinzette gequetscht. Es konnte dort die stärkste Ödembildung des Muskelgewebes nachgewiesen werden. Somit wurde dieses Verletzungsmerkmal nicht als vitales Zeichen in der histologischen Untersuchung gewertet.

Bei der weiteren Auswertung der strukturellen Verletzungszeichen konnten in zehn Proben eindeutig Fasernekrosen nachgewiesen werden. Es konnte aber kein Bezug zur Häufigkeit in einem bestimmten Muskel festgestellt werden. Fasernekrosen traten in sonst unauffälligen Muskeln wie dem M. rectus (n=1) und dem M. longissimus (n=1) auf.

Jedoch konnten auch im M. obliquus in drei Proben Fasernekrosen gefunden werden. Faserrisse konnten nur in einer M. splenius- und einer M. longissimus-Probe nachgewiesen werden. Da das physiologische Auftreten einer Fasernekrose bei einem so jungen Tier als unwahrscheinlich betrachtet werden kann, wird davon ausgegangen, dass die Fasernekrose als Antwort einer muskulären Verletzung nachweisbar war. Warum nur in zwei Proben ein Faserriss festzustellen war bleibt unklar. Eine Erklärung könnte sein, dass von jeder Muskelprobe nur jeweils drei histologische Schnitte untersucht wurden und deshalb nicht alle Verletzungsmerkmale sicher erfasst werden konnten.

Um Verletzungen bei den Tieren vor Versuch durch beispielsweise den Transport vom Züchter zur Versuchsanlage oder mögliche Kampfverletzungen in den Stallungen auszuschließen, wurde eine Berliner-Blau-Färbung durchgeführt. Es wurden Schnitte ausgewählt, bei denen eine deutliche, also flächenhafte Einblutung im HE-Schnitt nachgewiesen wurde. Wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, wird bei dieser Färbung Hämosiderin nachgewiesen, ein zellulär gebundenes Abbauprodukt des Blutfarbstoffes Hämoglobin. Dies dient der Entsorgung von Eisen in Einblutungsgebieten. Da Hämosiderin jedoch frühestens nach drei Tagen post Trauma nachgewiesen werden kann (Mulisch, 2010), kann daher bei positiver Reaktion in den

Muskelschnitten davon ausgegangen werden, dass die Einblutungen vor der experimentellen Traumasetzung im Muskel entstanden sein mussten. In keinem der untersuchten Muskeln konnte ein positiver Hämosiderin-Nachweis befundet werden. Die Schweine sollten zumindest drei Tage vor Versuch noch keine Verletzungen in der zervikalen Muskulatur erlitten haben. Der Schweinetransport vom Züchter zur Versuchsanlage war etwa fünf Tage vor Versuch. Transportbedingte Verletzungen die sich auf die zervikale Muskulatur ausgewirkt haben könnten, können somit ausgeschlossen werden. Ein Kritikpunkt ist hier natürlich, dass zwei beziehungsweise ein Tag vor Versuch nicht ausgeschlossen werden kann, dass kleinere Verletzungen in der posterioren HWS Muskulatur vorlagen.

Die Schweine wurden jedoch makroskopisch vor Versuch genauestens auf Verletzungen untersucht. Ein Schwein zeigte mehrere Kratzer im Nackenbereich, die sich jedoch bei der Obduktion als oberflächlich darstellten und nicht bis in die Muskulatur reichten. Es ist nicht davon auszugehen, dass die Schweine vor dem Versuch einem so starken Trauma ausgesetzt waren, welches deutliche Einblutungen in der zervikalen Muskulatur erklären würde.

Eine weitere Färbung wurde zum Vitalitätsnachweis der befundenen Einblutungen im HE-Schnitt durchgeführt. Die immunhistochemische Anfärbung von Fibronectin wird häufig in der Rechtsmedizin zur Wundaltersschätzung hinzugezogen um zu klären, ob die Verletzung prä- oder postmortal entstanden ist. Die Auswertung erfolgte nach Angaben von Betz (1992, 2007). Fibronectin kann als einer der frühesten Verletzungsparameter nachgewiesen werden, da es bereits innerhalb von wenigen Minuten Überlebenszeit nachgewiesen werden kann (Betz, 2007). Dieser Marker war für vorliegende Arbeit deshalb interessant, da nur wenige Verletzungsmarker in den ersten Stunden nach Verletzungen nachgewiesen werden können. Bei der Auswertung der Schnitte konnte jedoch keine eindeutig positive Fibronectinreaktion nachgewiesen werden. Laut Betz et al. (1992) und Hauser et al. (1990) liegt eine eindeutig positive Reaktion nur dann vor, wenn „eine kräftige Reaktion in Form von sich verzweigenden Strukturen auch außerhalb von Blutungsarealen sowie der Präparatränder feststellbar ist“. Eine so

eindeutige Reaktion lag in den untersuchten Schnitten nicht vor. Es ist bei dieser Färbung sehr schwierig, vitale von postmortalen Reaktionen eindeutig zu unterscheiden, da auch postmortal eine schwache Anfärbbarkeit innerhalb der Blutungsareale vorliegen kann. Diese stellen sich jedoch eher als fleck- beziehungsweise strangförmig dar, was auch in unseren Schnitten teilweise der Fall war. Trotz des fehlenden positiven Fibronektin-Nachweises kann davon ausgegangen werden, dass die Einblutungen durch das Trauma hervorgerufen wurden, also vital entstanden sind. Die Einblutungen zeigten in allen Schnitten deutliche vitale Reaktionen in Form von frühen Entzündungszellen die sich auch mit dem Überlebenszeitrahmen der Tiere nach Traumasetzung in Einklang bringen lassen.

Ein möglicher Grund für die fehlende positive Fibronektinreaktion kann u.a. an dem verwendeten Antikörper liegen. Der Antikörper [Polyclonal Rabbit Anti-Human Fibronektin. A 0245, Dako, Dänemark] zeigt laut Datenblatt zwar eine Kreuzreaktion im Schwein, d.h. der Antikörper besitzt die Fähigkeit auch an andere Strukturen als die des Zielanalyten (Mensch) zu binden, was jedoch nicht bedeutet, dass der spezifische Antikörper auch zu 100% für das analysierte Gewebe geeignet sein muss. Die Verdünnung des Antikörpers wie sie hier vorlag, ist nach dem Standardprotokoll ausgewählt worden (1:800). Es könnte jedoch sein, dass die Verdünnung für diese Schnitte zu hoch war (Maximalverdünnung) und eine niedrigere Verdünnung mit 1:400, deutlichere Ergebnisse bringen würde, dies wurde jedoch nicht überprüft. Das Färbeprotokoll wird üblicherweise für humane Proben verwendet. Es wurde angenommen, dass diese standardisierte Färbemethode auch für die Paraffinschnitte der porzinen Muskeln adäquat ist. Nach Rücksprache mit Kollegen aus dem Friedrich-Bauer-Institut sind Probleme mit Antikörpern in der immunhistologischen Untersuchung von porzinem Gewebe nicht unüblich. Humane Antikörper werden für den Einsatz an porzinen Proben laut Hersteller als geeignet beschrieben, was sich aber oft nicht bestätigt. Auch bei der immunhistologischen Untersuchung der Spinalganglien, die von schwedischen Kollegen immunhistochemisch untersucht werden, erscheint es schwierig einen passenden Antikörper für das porzine Gewebe zu finden. Die

standardhistologischen Untersuchungen lieferten die eindeutigsten Ergebnisse bei der Befundung der posterioren zervikalen Muskeln. Einblutungen sowie erste zelluläre Abräumreaktionen und strukturelle Verletzungen, können mit der HE-Färbung eindeutig und schnell nachgewiesen werden. Immunhistologische Untersuchungen sind sehr sensitiv in Bezug auf Temperatur, Zeit (Gefahr der Austrocknung der Schnitte), Wahl der Antigen-Demaskierungsmethode und Wahl des Antikörpers und dessen Verdünnung. Das Fehlen eindeutig positiver Reaktionen darf oft nicht als isolierter Befund gewertet werden.

Bei Vorliegen der standardhistologischen Untersuchungsergebnisse, zusammen mit den Negativkontrollen und der Artefakt-Ausschlusskontrolle, konnten in dieser Studie Verletzungen der posterioren zervikalen Muskulatur durch das induzierte Translations-Extensions-Trauma nachgewiesen werden.

Bei Vergleich unserer Untersuchungsergebnisse der zervikalen Muskeln mit denen der Literatur zeigte sich, dass der M. splenius bereits in einer Studie von Kumar et al. (2004) als Ort der muskulären Verletzung diskutiert wurde. In dieser Studie wurden Freiwillige einem von rechtskommenden anterolateralen Aufprall ausgesetzt, mit Beschleunigungen zwischen 4,9 und 13,7 m/sec<sup>2</sup>. Die zervikale Muskelantwort wurde mit Hilfe der Elektromyographie (EMG) aufgezeichnet. Es konnte dort gezeigt werden, dass die Muskelantwort auf der gegenüberliegenden Seite des Aufpralls, und zwar im M. splenius, am größten war. Natürlich muss beachtet werden, dass der Aufprall in unserer Studie der eines Heckaufpralls entspricht, und dass unsere Testobjekte durch die Anästhesie keine Muskelantwort zeigten. Die Belastung auf die zervikalen Muskeln ist in unserer Studie ähnlich der einer passiven Zugbelastung während der Retraktionsphase, wohingegen in Kumar's Versuchen eine aktive Kontraktion während der Extension bei einem Frontalaufprall diskutiert wird. Vasavada et al. (2007) untersuchten in einer biomechanischen Studie die Muskelspannung u.a. in posterioren Nackenmuskeln (M. splenius capitis, M. semispinalis capitis und M. trapezius) nach simuliertem Heckaufprall. Das Resultat dieser Studie war, dass die posterioren Nackenmuskeln



wahrscheinlicher verletzt werden als der ventral gelegene M. sternocleidomastoideus und zwar während der Reboundphase. Eine Reboundphase wie sie während eines Heckaufpralls im realen Unfallgeschehen vorkommt, ist in unseren Versuchen nicht gegeben. Auch haben wir keine anterioren Muskeln wie beispielsweise den M. sternocleidomastoideus untersucht, da in dieser Studie nur posteriore Nackenmuskeln untersucht wurden. Die anterioren Muskeln konnten nicht untersucht werden, da keine Endotracheale Intubation durchgeführt werden konnte, sondern die Zugänge von extern erfolgten.

Dafür musste der Zugang zur Trachea freipräpariert werden und die anteriore Muskulatur war somit nicht mehr frei zugänglich und durch den Eingriff schon von vornherein verletzt.

In unseren Studien konnten wir im posterioren zervikalen Muskel, dem M. splenius und im Repräsentanten des M. semispinalis capitis im Schwein Verletzungen in Form von Einblutungen und strukturellen Verletzungen mit einhergehender Entzündungsreaktion nachweisen.

Der M. obliquus capitis cranialis ist laut unseres Wissens bisher noch nicht spezifisch im Bereich der HWS-Distorsion untersucht worden. Uhlig et al. (1995), fanden in einer Studie heraus, dass Patienten, bei denen eine Spondylodese durchgeführt wurde, Auffälligkeiten in Ihrer Muskelfaserkomposition zeigten. Es wurden unter anderem dorsale Rückenmuskeln wie der M. rectus capitis posterior major, M. obliquus capitis inferior, M. splenius und M. trapezius auf Muskelfaserumstrukturierung untersucht. Es zeigte sich, dass im M. obliquus eine Fasertransformation in den Typ-IIc stattfand. Der Anstieg der relativen Type-IIc Fasermenge reflektiert ganz deutlich eine laufende Muskelfasertransformation. Dieses Phänomen lag laut Uhlig et al. (1995) auch in Patienten mit Weichgewebsverletzungen vor, wie z.B. bei einer HWS-Distorsionsverletzung. In Neuralgie-Studien, bei denen der Fokus auf lokaler Nervenblockade und deren Visualisierung lag, wurde der N.occipitalis major untersucht (Großer Okzipitalnerv, GON), welcher oberhalb des M. obliquus liegt (Ducic et al. 2009, Greher et al. 2010). Es ist bereits bekannt, dass initiale Gewebeschäden zu einer Sensibilisierung des zentralen Nervensystems führen können, so dass eine geringfügige Muskelverletzung bereits über nozizeptive Impulse zu

einer übertriebenen Schmerzreaktion führen kann (Curatolo, 2009). Muskeln, die sich in stark innervierten Arealen befinden, so wie der M. obliquus (Greher et al. 2010), der M. trapezius (Magnusson et al. 1996) oder der M. semispinalis (Vital et al. 1989, Bovim et al. 1991, Bogduk 1981), könnten daher auch in Zukunft ein interessantes Ziel für die Untersuchung im Zuge der HWS-Distorsionsverletzung darstellen. Der tiefe M. rectus zeigte sich in unserer Studie im Bezug auf Verletzungsmuster sehr unauffällig.

Nichts desto weniger wurde dieser Muskel bereits in anderen Studien als ein wichtiger Ort der suboccipitalen Muskelregion diskutiert, gerade im Zusammenhang mit der HWS-Distorsion. Laut McPartland (1999) führt die HWS-Distorsion zur Atrophie in diesem Muskel. Scali et al. (2011), untersuchten die anatomische Verbindung zwischen dem M. rectus capitis posterior major und der Dura Mater. Diese Studie gab an, dass klinische Manifestationen in Zusammenhang mit der Beziehung dieses Muskels und der Dura Mater entstehen könnten.

Mit der aktuell verfügbaren Bildgebung können wir die anatomischen Verbindungen zwischen dem M. rectus und den benachbarten Geweben in Schweinen noch nicht ausreichend studieren.

Elliott et al. (2006) zeigten, dass Patienten, die eine HWS-Distorsionsverletzung erlitten, einen signifikant größeren Anteil an Fettinfiltration u.a. im M. rectus capitis posterior major aufwiesen als die gesunden Korrelate. Nach Literaturrecherche gibt es jedoch keine Studien, die im M. rectus Einblutungen im Zusammenhang mit einer HWS-Distorsion nachweisen konnten.

Bei der weiteren Literaturstudie über Verletzungen der zervikalen Muskulatur im Zusammenhang mit WADs wurde zusammenfassend festgestellt, dass keine Forschungsarbeit bisher einen eindeutigen klinischen Nachweis erbrachte, welcher die Muskeln als primären Verletzungsort nachweist (Curatolo et al., 2011). In älteren Studien von Wikström (1967) und MacNab (1969) konnten im Tiermodell Muskelverletzungen nachgewiesen werden. In späteren Studien konnten diese Befunde jedoch nicht verifiziert werden (Svensson, 1993). Auch werden muskuläre Pathologien eher der „Akuten Phase - Beschwerden“ zugeordnet als der Langzeitbeschwerden (Scott and Sanderson, 2002;

Siegmund et al., 2009), da angenommen wird, dass Muskelfaserrisse und Zerrungen innerhalb von Wochen ausheilen und eine Narbe entsteht, aber keine Schmerzen verbleiben (Barnsley et al., 1994). Es wurde häufig diskutiert, dass die Muskulatur ein Areal für sekundäre Schmerzreaktion ist. Der nozizeptiven Schmerzreaktion scheinen jedoch andere Strukturen der HWS wie z.B. Verletzungen der Facettengelenke oder der Ligamente zu Grunde zu liegen (Graven-Nielsen, 2006; Panjabi, 2006).

In den letzten Jahren wurden auch immer wieder bildgebende Verfahren an Patienten nach Verkehrsunfällen mit akuten oder chronischen Beschwerden durchgeführt um festzustellen, ob Weichteilverletzungen wie z.B. Muskelrupturen mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (MRT), Computertomographie oder Ultraschall nachgewiesen werden können.

Gerade die MRT- und CT-Studien konnten Weichteilverletzungen im Zusammenhang mit dem Trauma in den meisten Fällen nicht nachweisen und stellen diese bildgebenden Verfahren als Nachweis von Weichteilverletzungen im Zusammenhang mit HWS-Distorsionsverletzungen in Frage (Borchgrevink et al., 1995; Pettersson et al., 1997; Yoganandan et al., 2001; Myran et al., 2008). Nur wenige Studien fanden Pathologien in den bildgebenden Verfahren, aber auch da nur in einzelnen Fällen (Ronnen et al., 1996; Kongsted et al., 2008; Anderson et al., 2012). Es herrscht jedoch Einigkeit darin, dass die bildgebenden Verfahren weiter verbessert werden müssen, damit Verletzungen der Weichteilgewebe besser dargestellt und interpretiert werden können (Van Geothem et al., 1996; Krakenes et al., 2003; Johansson, 2006).

In vorliegender Studie wurde ein Schwein vor und nach Exposition einer Translations-Extensionsbewegung im MRT untersucht. Es konnten dort in zwei zervikalen Muskeln (M. splenius und M. complexus) deutliche Signalanhebungen dargestellt werden, die eine Einblutung im Gewebe zeigen, was sich auch mit den histologischen Ergebnissen deckt. In der Bildgebung wurden keine knöchernen Verletzungen der Wirbelkörper oder der Bandscheiben festgestellt. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen der Obduktion überein.

## 5.2 Verletzungsdetektion - zervikale Facettengelenke

Die Entnahme der Facettengelenke gestaltete sich zunächst schwierig, da die anatomische Lage der porzinen Facettengelenke klar lokalisiert werden musste. Wie bereits im Material- und Methodenteil beschrieben, wurden die Gelenke mit Hilfe einer oszillierenden Säge entnommen. Dies bedarf besonderer Vorsicht, da die Gelenkkapsel sehr schnell rupturiert werden kann. Es konnten jeweils Facettengelenke der Höhen C2/3 bis C5/6 entnommen werden. Aufgrund ihrer anatomischen Lage konnten die Facettengelenke auf Höhe C6/7 nicht entnommen werden, da diese durch die enorme Höhe des Prominens und der Lage des Schulterblattes nicht frei zugänglich waren.

Nach ausreichender Formalinfixierung mussten die Gelenke zunächst entkalkt werden, um die knöchernen Anteile in Folge zuschneiden zu können. Zunächst wurde die weniger schonende Methode mit Hilfe einer 10%igen Salzsäurelösung getestet. Der Vorteil dieser Demineralisierungsmethode war der Zeitfaktor, da diese Entkalkungsmethode eines kompletten Gelenkes nur etwa zwei Wochen dauert. Der Nachteil zeigte sich in Folge der Entkalkung darin, dass die Weichteilstrukturen teilweise stark in Mitleidenschaft gezogen wurden und die Färbungen nicht mehr optimal durchgeführt werden konnten. Daher wurde später auf eine schonendere Methode mit 10% iger Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA] gewechselt. Nachteil dieser Methode ist die lange Entkalkungszeit, die etwa bei zwei Monaten pro Gelenk lag. Auch war ein häufiger Lösungswechsel notwendig (dreimal wöchentlich), damit eine optimale Entkalkung gewährleistet werden konnte. Der Vorteil dieser Methode liegt ganz klar darin, dass die Gelenkstrukturen weiterhin gut erhalten bleiben und sehr gute histologische Schnitte hergestellt werden konnten. Die histologischen Färbungen zeigten zufriedenstellende Ergebnisse.

Es konnten nach Ausschluss von beschädigten Facettengelenken durch die Entnahme insgesamt 26 (22 exponierte, 4 Negativkontrollen) intakte Gelenke histologisch untersucht werden.

Befundete Einblutungen befanden sich bei allen untersuchten Gelenken im periostalen Weichgewebe. Die häufigsten Einblutungen konnten dabei auf Höhe C3/4 nachgewiesen werden, die geringsten auf Höhe C5/6. Auch die Negativkontrolle auf Höhe C5/6 zeigte Einblutungen, wohingegen sich die Negativkontrollen der Facettengelenke von C2/3 bis C4/5 unauffällig zeigten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Vorkommen der Einblutung in der Negativkontrolle entnahmebedingt entstanden ist, da dort auch keine vitalen Zeichen in Form von Entzündungsreaktionen vorlagen. Vitale Zeichen lagen auch in den exponierten Proben nur in sehr geringem Maß vor, sodass nur die Verletzungen mit eindeutiger zellulärer Reaktion als vital, also traumakausal, gewertet werden können. Deutlich zeigten sich vitale Entzündungszeichen nur in zwei Proben auf Höhe C4/5 und einmalig auf Höhe C2/3. Bei allen anderen Facettengelenksproben, die Verletzungen aufwiesen und keine deutliche vitale Reaktion vorlag, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese postmortal bei der Entnahme entstanden sind. Die Facettengelenksschnitte wurden im Transversalschnitt analysiert. Im Sagittalschnitt hätte möglicherweise eine Kapseldehnung des anterioren Teils oder Knorpelquetschungen des hinteren Anteils besser sichtbar werden können.

Verletzungen der Facettengelenke wurden von vielen Autoren häufig im Zuge einer HWS-Distorsion als Ort der Schmerzbildung diskutiert (Aprill et al., 1992; Barnsley et al., 1993, 1994; Lord et al., 1996; Ono, 1997; Yoganandan, 1997; Panjabi et al., 1998a , 1998b; Yoganandan et al., 1998; Winkelstein, et al. 2000; Siegmund et al., 2001). In Experimenten mit Leichenversuchen oder auch in Tierversuchen und durch Datenerhebung anhand von Patienten, die unter den Folgen einer HWS-Distorsion litten, konnten durch experimentelle, radiographische und/oder operative Studien Verletzungen in den Facettengelenken festgestellt werden (Barnsley et al., 1994). In Tierversuchen wurden viele Strukturen der HWS untersucht, jedoch lag der Hauptfokus auf den Gelenkkapseln der Facettengelenke (Curatolo, et al. 2011).

Mit unabhängigen Tierversuchen in verschiedenen Spezies bestätigten sich immer wieder die Ergebnisse der biomechanischen Befunde aus Kadaverversuchen, die eindeutig Gelenkkapselverletzungen nachwiesen.

In einigen biomechanischen Studien wurde gezeigt, dass hauptsächlich die Facettengelenke der Höhen C2/3 und C5/6 bis C6/7 die symptomatischen Bereiche im Zusammenhang nach Verkehrsunfällen darstellten (Kaneoka et al., 1999; Cusick et al., 2001; Pearson et al., 2004). Studien von Aprill und Bogduk (1992) und Barnsley et al. (1994) zeigten, dass 25-62% der Patienten, die Schmerzen in der Nackenregion angaben, die Facettengelenke als Verletzungsursache identifiziert wurden und dass die Zervikalregion der Höhe C5 bis C7 am häufigsten im Zusammenhang mit HWS-Distorsionsverletzungen nachgewiesen wurden (Bogduk, 1988; Barnsley et al., 1995).

Histologische Studien im Kaninchen- und Rattenmodell sowie mit humanem Leichengewebe konnten nozizeptive Nervenfasern darstellen, die sich durch die Strukturen der Facettengelenke und Gelenkkapselligamente erstrecken. Diese Studien implizieren, dass der Nervenreiz eines Facettengelenks durch Belastung des gesamten Gelenkes oder der umliegenden Gewebe ausreichend hoch ist um einen Schmerzreiz zu induzieren respektive zu modulieren (Giles and Harvey, 1987; McLain, 1994; Cavanaugh et al., 1996; Inami et al., 2001; Ohtori et al., 2001).

Auf die HWS-Distorsion bezogen, beziehungsweise auf das durch den Bewegungsablauf bei einem Heckaufprall hervorgerufene Trauma, werden durch die Kinematik exzessive Extensionstraumen in der unteren HWS, wie z.B. Zusammenstoß der Facettengelenke, Quetschungen der Synovialfalten und Dehnung der Gelenkkapsel beschrieben (Grauer et al., 1997; Yoganandan and Pintar, 1997; Ono, 1997; Panjabi et al., 1998a, 1998b; Winkelstein et al., 2000; Siegmund et al., 2001). In biomechanischen PMHS-Versuchen wurden die Gelenkkapseln unter verschiedenen Belastungssituationen wie Flexion, Extension und unter kombinierter Krümmungs- und Zugbeanspruchung getestet.

Es konnte in den Versuchen gezeigt werden, dass die Gelenkkapsel gerade bei Belastungen im Niedrigenergiebereich ein großes Verletzungspotenzial aufweist. Es wurden Spannungsmessungen durchgeführt welche darauf schliessen lassen, dass die Toleranzgrenzen überschritten wurden (Winkelstein et al., 2000; Siegmund et al., 2001). In vorliegender Arbeit konnten in keiner der untersuchten Gelenke Verletzungen in den Gelenkkapseln nachgewiesen werden, jedoch sind in dieser Studie in vivo Versuche mit Schweinen mit einer sehr hohen Energie durchgeführt worden. Die Versuche sind also nicht wie bei Siegmund und Winkelstein beschrieben mit isoliertem Gewebe mit geringer Energie durchgeführt worden und können auch daher nicht direkt miteinander verglichen werden. Es wurden periostale Weichteileinblutungen befundet, aber deutliche Verletzungen waren mit der standardhistologischen Färbung in dieser Studie nicht zu sehen.

Die Untersuchungen der Facettengelenke sind mit einem enormen Zeitaufwand, besonders durch die zeitintensive Entkalkungsmethode verbunden, daher konnten auch nur sehr wenige Facettengelenke untersucht werden. Im Phasen-Kontrast-Röntgen wurden vier exponierte Facettengelenke und vier Negativkontrollen untersucht. Wie sich zeigte, ist diese Methode zur Darstellung der einzelnen Strukturen eine gute Wahl. Vorallem bei der Darstellung der Weichgewebe zeigt sie im Vergleich zum MRT deutliche Vorteile. Die unterschiedlichen Gewebe, wie Knochen- und Knorpelstrukturen, der Gelenkspalt, sowie die Gelenkkapsel und umliegendes Fett- und Bindegewebe konnten klar voneinander differenziert werden. Die Einblutungen konnten jedoch in den untersuchten Ausschnitten nicht detektiert werden. Die Auflösung ist ebenfalls noch nicht ausreichend um z.B. Verletzungen der Gelenkkapsel nachzuweisen. Ein weiterer Punkt ist, dass zukünftig alle Ebenen durchgesehen werden müssen um beispielsweise einen Gelenkkapselriss detektieren zu können, was mit dem aktuellen Stand dieser Technik und mit der Größe der Facettengelenke noch nicht möglich war.

Insbesondere sollten zukünftig Quetschungen der Synovialfalte im Sagittalschnitt analysiert werden.

Mit der weiteren Optimierung dieses bildgebenden Verfahrens und der wachsenden Expertise der Radiologen mit dieser Methode, könnten in weiterer Kooperationsarbeit die Anatomie der Facettengelenke und deren Pathologien im Zuge einer HWS-Distorsion näher untersucht und befundet werden.

### **5.3 Diskussion Tiermodell**

Dass das Schwein dem Menschen im Bezug auf dessen Physiologie ähnelt, ist schon lange bekannt. Mittlerweile hat dieses Tier aber auch im Bereich Biomedizin als adäquates Versuchsmodell stark an Forschungsinteresse gewonnen (Smith, 2000). Es stellt sich die Frage in wie weit die Ergebnisse dieser Studie auf die realen Verletzungen einer HWS-Distorsion Bezug finden, da natürlich anatomische Unterschiede zwischen Schwein und Mensch vorliegen. Bei der Wahl eines Tiermodells ist es nötig die Ergebnisse auf anatomische Unterschiede und Ähnlichkeiten des Modells in Bezug zum Menschen zu untersuchen. In einigen Studien wurde das Schwein als geeignetes Modell zur Untersuchung der Wirbelsäule und zugehörigen Geweben beschrieben. Besonders häufig werden Schweine als Modell bei Implantationsstudien beziehungsweise zur Optimierung von bereits bestehenden Operationstechniken verwendet (Bozkus et al., 2005; Schmidt et al., 2005; Kettler, 2007; Newton, 2010). Andere Studien untersuchten die biomechanischen Eigenschaften der porzinen Wirbelsäule und testeten diese in Bezug auf die Vergleichbarkeit respektive die Eignung als Modell für die humane HWS (Dickey, 2003; Drake, 2005; Dath et al., 2007; Wilke et al., 2011). Yingling et al. (1999) zeigten in einer Studie, dass die porzine HWS als Modell zur Untersuchung der Verletzungen an humanen Lendenwirbelsäulen sich als geeignet darstellt. Auch in Bereichen der HWS-Distorsion wurden Schweine als Versuchsmodell beschrieben. Ortengren et al. (1996), untersuchten Verletzungen der Spinalganglien nach induziertem Extensionstrauma. Diese Studie



besagte, dass ein direkter Vergleich durch die anatomischen Unterschiede zwischen Mensch und Schwein aufgrund der verschiedenen Maßstäbe der zervikalen Wirbelsäule nicht möglich sei, dass jedoch die allgemeine Anatomie durchaus vergleichbar sei. Die Auswahl der Schweine in dieser Studie in Bezug auf Alter und Größe zeigte eine Länge der zervikalen Wirbelsäule von etwa 12 cm, was sich in etwa mit der von Menschen deckt. Des Weiteren besitzt das Schwein die gleiche Anzahl an zervikalen Wirbeln. Auch ist der Bewegungsumfang der HWS zu dem der Menschen sehr ähnlich. Die Kopf-Extensionswinkel in der vorliegenden Studie erreichten etwa 80 Grad, was sich mit den Ergebnissen von (Mertz, 1967) deckt, welche sehr ähnliche Extensionswinkel in Leichenversuchen zeigten. Zu den anatomischen Unterschieden der HWS zwischen Mensch und Schwein zeigten sich vor allem die Relationen zwischen den Höhen der zervikalen Wirbel. Die Wirbelkörper auf Höhe C1 und C2 sind im Schwein deutlich höher. Auch sind die Dornfortsätze, vor allem auf Höhe C6 und C7, im Schwein wesentlich länger als im Menschen. Der intervertebrale Bewegungsumfang im Vergleich Mensch und Schwein zeigte in Bezug auf Flexions- und Extensionsbewegung auch unterschiedliche Ergebnisse. Bei Betrachtung der Flexion-Extensionbewegung zeigte die humane zervikale Wirbelsäule einen größeren Bewegungsumfang als die porcine HWS (Wilke et al., 2011). Diese anatomischen Unterschiede führen natürlich zwangsläufig zu unterschiedlichen Belastungsverteilungen in den Geweben der HWS. Jedoch gilt für beide Spezies, dass ein hoher Anteil der Beschleunigungsenergie durch die große Muskelmasse des Nackens abgefangen wird.

Es muss deutlich darauf hingewiesen werden, dass ein Tiermodell immer nur einen Kompromiss darstellt und nur zur Unterstützung von Forschungsfragen dient. Es kommt auf die spezifische Fragestellung der geplanten Studien an und somit muss das passende Tiermodell natürlich mit Bedacht gewählt werden. Das Schweinmodell, das in dieser Studie verwendet wurde, stellte sich aus folgenden Gründen als geeignet dar:

Erstens, aufgrund der Vergleichbarkeit der Dimensionen der zervikalen Wirbelkörper, zweitens wegen der Vergleichbarkeit der Struktur und Anzahl der posterioren zervikalen Muskeln.

## **5.4 Allgemeine Diskussion und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe des gegebenen Versuchsaufbaus herauszufinden, ob mit der induzierten Translations-Extensionsbewegung Verletzungen an der HWS von Schweinen hervorgerufen werden können und ob diese mit histologischen, biochemischen und bildgebenden Methoden darzustellen sind. Dieser Versuchsaufbau, wie er hier zur Traumasetzung verwendet wurde, wurde bereits von Svensson (1993) und Ortengren et al. (1996) in Studien zur Untersuchung der Spinalganglien im Zuge eines induzierten Extensionstrauma beschrieben. In vorliegender Arbeit wurde prinzipiell das gleiche Versuchsdesign verwendet wie bei Svensson und Ortengren. Es wurden ebenfalls Beschleunigungsmessungen im Spinalkanal vorgenommen um zu zeigen, dass eine Kinematik ähnlich der bei einem Heckaufprall vorliegt. Aus den Daten der Pulskurven und der Aufnahmen der High-Speed Kamera konnte festgestellt werden, dass der Versuchsaufbau adäquat war um die Kinematik des Nackens ähnlich wie bei der eines Heckaufpralls (ohne Kopfstütze) zu repräsentieren. Da heutzutage standardmäßig Kopfstützen in Automobilen eingebaut sind, wird eine Extension so wie sie sich hier in den Versuchen zeigte, kaum mehr vorkommen. Die Translationsbewegung repräsentiert den Bewegungsablauf der Ersten Phase (Retraktionsphase) in einem Heckaufprall mit hoher Geschwindigkeit. Diese Phase wird noch immer als jene mit dem höchsten Verletzungspotenzial diskutiert.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist die extrem hohe Energie, die in vorliegender Studie zur Traumasetzung eingesetzt wurde. Die mittlere Beschleunigung lag bei etwa 20 g und einer Pulsdauer von 40 ms. Im realen Unfallgeschehen sind HWS-Distorsionsfälle in diesen Bereichen extrem selten. In einer Studie von Krafft (2002) zeigte sich, dass im realen Unfallszenario die Chance Schmerzsymptome zu entwickeln auf 100% stieg, sobald die mittlere Beschleunigung 7 g übersteigt. Es kann davon ausgegangen werden, dass bei einer so hohen Beschleunigung wie sie hier eingesetzt wurde, Verletzungen an Strukturen der HWS auftreten. Der Grund für die Wahl einer so hohen Beschleunigung war, dass in dieser Arbeit das Vorliegen von Verletzungen erwünscht war, um zu untersuchen mit welchen Methoden diese nachgewiesen werden können. In Folgeprojekten soll nun gezeigt werden, ob Verletzungen auch im Niedrigenergiebereich vorliegen. Ein zusätzlicher Diskussionspunkt sind die unterschiedlichen Testkonditionen, wie die unterschiedliche Überlebenszeit der Tiere. Eine Überlebenszeit von vier Stunden ist sehr wenig, um eindeutige Entzündungsreaktionen nachweisen zu können, daher wurde die Überlebenszeit bei zwei Schweinen auf sechs Stunden verlängert. Auch nach sechs Stunden können beispielsweise bestimmte Immunozyten im Zuge des Wundheilungsprozesses noch nicht nachgewiesen werden. Bei einem Schwein lag die Überlebenszeit bei 9.5 Stunden, da bei diesem Tier post Trauma noch ein MRT durchgeführt wurde und dies einige Zeit in Anspruch nahm. Aber auch bei diesem Tier zeigte sich keine gesteigerte Entzündungsreaktion. Nach zwölf beziehungsweise 24 Stunden liessen sich mehr Entzündungszellen und Reparaturprozesse nachweisen. Laut Ethikantrag durften die Tiere im Rahmen dieser Studie nicht länger am Leben erhalten werden. Für die weiteren Studien sollten auch längere Überlebenszeiten der Tiere untersucht werden, um so noch detaillierter Entzündungsreaktionen untersuchen zu können.

Diese Arbeit war Teil einer Pilotstudie, bei der in Zusammenarbeit mit dem Karolinska Institut in Schweden und der Chalmers Universität in Göteborg, verschiedene Strukturen der HWS nach induziertem Translations-Extensionstrauma mit Hilfe von verschiedenen Untersuchungsmethoden analysiert wurden. Zusammenfassend zeigte sich, dass die Entnahmetechnik der Muskeln sich als sehr geeignet und effizient darstellte. Bei der Entnahme der Facettengelenke konnte bisher noch nicht ausgeschlossen werden, dass die Einblutungen teilweise, d.h. bei fehlender zellulärer Reaktion, auch obduktionsbedingt entstanden sind. Ein weniger invasives Verfahren würde eventuell geeigneter sein, um die Facettengelenke auf Verletzungen hin zu untersuchen. Es wäre möglich die komplette HWS zu entnehmen, zu fixieren und dann erst die einzelnen Gelenke zu präparieren, sodass keine Einblutungen mehr postmortal im Gelenk auftreten können. Die gewählte Entkalkungsmethode mit 10%igem EDTA zeigte zufriedenstellende Ergebnisse, jedoch war der Zeitaufwand enorm, sodass insgesamt nur wenige Gelenke untersucht werden konnten. Eine Kombination aus sanfter Entkalkung mit EDTA und einer Säure wäre eventuell für standardhistologische Untersuchungen von Vorteil um die Entkalkung zu beschleunigen. Bei der weiteren HWS-Distorsions-Forschung würde es sich anbieten noch weitere Serummarker zu untersuchen. Interessant wären hierbei das Muskelprotein Myosin, jedoch müsste dann die Überlebenszeit der Tiere auf 1-2 Tage erhöht werden. Das größte Manko dieser Studie zeigte sich, wie bereits erwähnt, in der kurzen Überlebenszeit der Tiere, da viele Muskelproteine aufgrund Ihrer Nachweisgrenzen nicht untersucht werden konnten. Gerade die Untersuchung der Serumproben wäre auch im realen Unfallgeschehen als diagnostisches Mittel ein interessanter Ansatz. Eine weitere interessante und vielversprechende Untersuchungsmethode wäre das neuartige Röntgenverfahren (Phasen-Kontrast-Röntgen), welches im kleinen Maßstab für die Darstellung der Facettengelenke hinzugezogen wurde. Dieses Verfahren wird bisher noch nicht klinisch zur Untersuchung von Patienten eingesetzt, zeigt sich aber jetzt schon als zukünftig vielversprechendes Röntgenverfahren.

Das Phasen-Kontrast-Röntgen ist geeignet um einzelne Gewebsstrukturen deutlich voneinander abzuheben, ob es geeignet ist um kleinere Verletzungen im periostalen Weichgewebe aufzuzeigen bleibt zu prüfen. Wie bereits angemerkt, soll die extrem hohe Energie bei Traumasetzung in zukünftigen Studien herabgesetzt werden um näher an das reale Unfallgeschehen im Zusammenhang mit HWS-Beschwerden zu kommen.

Diese Studie zeigte sich als guter Ansatz um verschiedene Untersuchungsmethoden nach Traumasetzung in verschiedenen Geweben zu analysieren und Verletzungen darzustellen. Sie stellt jedoch nicht dar, welche Verletzungen bei einer HWS-Distorsion vorliegen.

## Zusammenfassung

Zur Erforschung von Verletzungspathologien im Zuge von HWS-Distorsionen gibt es bislang unterschiedliche Ansätze und Modelle, die nicht nur den Verletzungsmechanismus untersuchen, sondern auch vermutete verletzte Strukturen. Klar ist bisher noch immer nicht ob bei der oft diagnostizierten HWS-Distorsion überhaupt immer von Verletzungen auszugehen ist und wenn ja wo genau diese Verletzungen im Bereich der HWS vorliegen. In vorliegender Arbeit wurden zehn anästhesierte Schweine der schwedischen Landrasse einer Translations-Extensionsbewegung mit Hilfe eines speziellen Versuchsaufbaus ausgesetzt, um den Bewegungsablauf ähnlich dem eines Heckaufpralls zu simulieren. Die durchschnittliche Beschleunigung des Kopfes lag bei 20 ( $\pm 2$ ) g. Als Negativkontrolle wurden drei Schweine ebenfalls anästhesiert und gleichermaßen für den Versuch vorbereitet, jedoch wurde kein Heckaufprall simuliert. Ziel war es zu untersuchen, ob Verletzungen in unterschiedlichen Geweben der HWS durch das Trauma hervorgerufen werden konnten. Die zervikale Muskulatur, die zervikalen Facettengelenke, sowie Serumproben wurden mit Hilfe von histologischen, radiologischen und biochemischen Analysemethoden auf Verletzungen, beziehungsweise Verletzungsmarker untersucht.

Das Hauptaugenmerk lag auf Untersuchungen acht verschiedener posteriorer Muskeln der HWS. Histologisch wurden insgesamt 45 Muskelproben aus sieben Versuchstieren der Zervikalregion histologisch analysiert. Die HE-Färbung wurde zur Untersuchung der Muskulatur auf Einblutungen, Entzündungsreaktionen und strukturellen Verletzungen, wie beispielsweise Faserrisse, untersucht. Die Berliner-Blau-Färbung, sowie die immunhistologische Fibronektinfärbung wurden zum Ausschluss von nicht-traumakausalen Blutungen hinzugezogen. Es wurden in etwa der Hälfte aller untersuchten Muskelproben Einblutungen detektiert. Die Befundung der Einblutungen wurde qualitativ (intramuskuläre/interstitielle Einblutung) sowie quantitativ (fleck- oder flächenförmig) vorgenommen. Die häufigsten Einblutungen fanden sich im tiefen M. obliquus sowie im M. splenius. Die stärksten Einblutungen

(flächenförmige Blutungen) traten im M. obliquus, M. splenius sowie M. complexus auf. Zelluläre Verletzungszeichen wie leukozytäre Infiltration wurden ebenfalls untersucht und konnten in knapp 90% der 45 analysierten Muskelproben detektiert werden. Strukturelle Verletzungszeichen in Form von Muskelfaserrissen und Fasernekrosen lagen relativ selten vor. Untersuchte Negativkontrollen zeigten keinerlei Verletzungszeichen. Alle detektierten Einblutungen und strukturellen Verletzungen der zervikalen Muskulatur konnten eindeutig als vitale Verletzungen nachgewiesen werden. Von einem Schwein wurden prä-mortale MRT-Aufnahmen vor und nach Setzung des Traumas vorgenommen. Es zeigten sich deutliche Signalanhebungen im Bereich des M. splenius sowie M. complexus, was auf Einblutungen schliessen ließ und sich anschliessend auch in der histologischen Untersuchung bestätigte.

Des Weiteren wurden insgesamt 26 Facettengelenke von acht Versuchstieren (22 exponierte; 4 Negativkontrollen) der Höhen C2/3 bis C5/6 histologisch untersucht. Einblutungen in das periostale Weichgewebe wurden in 59 % der exponierten Facettengelenke befundet. Am Häufigsten fanden sich Einblutungen auf Höhe C3/4, am seltensten auf Höhe C5/6.

Bei Analyse der Negativkontrollen fanden sich in einer Probe auf Höhe C5/6 Einblutungen, bei allen weiteren Negativkontrollproben konnte keinerlei Verletzung nachgewiesen werden. Im Einblutungsgebiet fanden sich nur auf Höhe C4/5 (n= 2) und C2/3 (n= 1) Entzündungszellen, welche eine vitale Reaktion nachweisen. Fehlende vitale Entzündungsreaktionen lassen darauf schließen, dass die Einblutungen nicht durch das Trauma entstanden sind sondern post mortal bei der Obduktion. Bei den radiologischen Untersuchungen der Facettengelenke wurden zwei Methoden angewandt: das Phasen-Kontrast-Röntgen und die Magnetresonanztomographie (MRT). Dafür wurden vier exponierte Facettengelenke und vier nicht-exponierte Facettengelenke von zwei Schweinen auf Höhe C2/3 bis C5/6 untersucht. Es zeigte sich, dass die einzelnen Strukturen der Gelenke mit der Phasen-Kontrast-Röntgenmethode deutlicher differenziert werden konnten als im MRT.

Verletzungen fanden sich jedoch in beiden radiologischen Methoden nicht.

Biochemisch wurden Serumproben von sechs Versuchstieren auf erhöhte Konzentration der Kreatinkinase-Muskeltyp (CK-MM) und des Myoglobins untersucht, um Rückschlüsse auf Verletzungen der Skelettmuskulatur ziehen zu können. Blutproben wurden dabei zu unterschiedlichen Zeitpunkten entnommen, um den Anstieg der CK- und Myoglobinkonzentrationen im zeitlichen Verlauf untersuchen zu können. Die Enzymaktivität der CK-Proben zeigte bei den exponierten Tieren einen Anstieg, vor allem in der ersten halben Stunde post Trauma. Der CK-Wert stieg bei den Negativkontrolltieren ebenfalls innerhalb der ersten halben Stunde nach Traumasetzung an, jedoch in einem viel geringeren Ausmaß. Die Konzentration der Kreatinkinase ist bei exponierten Proben zwischen 30 und 120 Minuten post Trauma am höchsten und sinkt danach wieder ab. In diesem Zeitrahmen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen Proben von exponierten Tieren und der Negativkontrollen. Aussagen zur Myoglobinkonzentration post Trauma konnten nicht getroffen werden. Der verwendete Marker der klinischen Chemie zeigte sich für die Analyse im Schwein als nicht geeignet. Die Messdaten konnten nicht ausgewertet werden.

Diese Arbeit ist nach aktuellem Wissensstand die erste, die die zervikale Muskulatur, die Facettengelenke sowie Serumproben auf Verletzungszeichen nach einem simuliertem HWS-Distorsionstrauma im Schwein untersucht hat. Es gab bisher nur sehr wenig Informationen bezüglich der porcinen zervikalen Muskulatur. Die Lokalisation der einzelnen Muskeln im Vergleich zur menschlichen zervikalen Muskulatur wurde selbstständig erarbeitet. In dieser Arbeit wurden erstmals Einblutungen im tiefen M. obliquus nachgewiesen, sowie Einblutungen im M.complexus und M.splenius zusätzlich durch das MRT bestätigt. Weitere Forschungsvorhaben sollten daher untersuchen, ob die Verletzungen der posterioren zervikalen Muskeln auch unter niedrigeren Expositionskräften auftreten.



Diese Studie zeigte, dass die CK-MM Enzymaktivität auch im Schweineserum nach muskulären Verletzungen in der klinischen Chemie nachgewiesen werden und somit als Verletzungsmarker eingesetzt werden können. Es zeigten sich in den Facettengelenken nur wenig eindeutige vitale Verletzungszeichen. Jedoch gibt es in der Literatur keine vergleichenden histologischen Untersuchungsergebnisse im Zusammenhang mit der HWS-Distorsion. Weitere histologische Untersuchungen zu Verletzungen in Facettengelenken gekoppelt mit radiologischen Untersuchungsmethoden würden gegebenenfalls mehr Aufschluss geben.

## Summary

To investigate the injury pathology in the course of whiplash injuries, several approaches and models were used so far, which analyzed not only the injury mechanism but also assumed structures that might be prone to injury. It has not yet been proven if there are always “real injuries” when diagnosing “whiplash trauma”.

In the present work ten porcine males of the swedish landrace were used to simulate a high-speed rear-end impact by using a special experimental-setup which forces the head of the animals to go into a translation-extension movement. The average acceleration of the porcine head was 20 ( $\pm 2$ ) g. For negative controls, three further pigs were also anaesthetized and processed in the same way as the test pigs, just without performing the exposure.

The goal of the study was to investigate whether injuries occur in different tissues of the cervical spine due to the trauma. The cervical muscles, cervical facet joints as well as serum samples were analyzed histologically, biochemically as well as with radiological examination methods to check for injuries or injury markers, respectively.

The main focus was put on the analysis of eight different muscles of the posterior cervical region. A total of 45 muscle samples out of seven exposed animals were analyzed histologically. The HE-stain was used to examine muscles for hemorrhage, inflammatory reactions and structural injuries like e.g. fibre rupture. The berlin-blue stain as well as the immunohistological fibronectin stain was used to exclude hemorrhage that can not be brought in line with the trauma.

Thereby, hemorrhage could be found in almost half of all analyzed muscle samples.

The appraisal of the bleedings was performed in a qualitative (intramuscular and/or interstitial bleedings) as well as quantitative (punctual and/or laminar bleedings) manner.

By detailed examination of single muscles, it shows that most bleedings were found in the deep obliquus muscle as well as in the splenius muscle. The strongest bleedings (laminar) were detected in the obliquus, splenius and complexus muscle.

Cellular injury signs, like leukocytic infiltration, were also analyzed and could be found in almost 90 % of the 45 analyzed samples. Structural injury signs in terms of muscle fiber rupture and fiber necrosis were seen rarely. The examined negative controls did not show any signs of injury at all.

Vital MR images were taken from one pig before and after trauma. An obvious increase in signal was found in the splenius and complexus muscles which can be brought in line with hemorrhage. This was subsequently confirmed in the histological examination.

Furthermore, a total of 26 facet joints from eight exposed porcines (22 exposed, 4 negative controls) were analyzed histologically in the range of C2/3 to C5/6. Summarized, hemorrhage in terms of bleedings in the periosteal soft tissue was detected in 59 % of exposed facet joints. Most frequently, bleedings were found in the range of C3/4, least at C5/6.

Analyzation of the negative controls found that one sample at C5/6 showed hemorrhage, all other negative controls did not show any signs of injury. Inflammatory cells were only seen in hemorrhage areas in two samples at C4/5 and one sample at C2/3, which proves a vital reaction. Missing vital inflammatory reactions can not be referred to the trauma and are probably caused by autopsy.

For radiologic analyzation of the facet joints, two methods were applied. A phase-contrast X-ray and MRI. Therefore, 4 exposed and 4 non-exposed facet joints out of two test animals were analyzed at C2/3 to C5/6. It appears that the single structures of a facet joint can be displayed more clearly with phase-contrast X-ray imaging. However, injuries could be verified by neither method.

Blood samples were analyzed biochemically, by examining samples of test animals for increased creatine kinase muscle type (CK-MM) and myoglobin concentrations in order to be able to draw conclusions on injuries to skeletal muscle. Blood samples were drawn at different time points in order to analyze the CK-MM and myoglobin concentrations in a chronological sequence.

The results of the CK-MM analysis show, that the enzyme activity of the exposed animals increases especially in the first half hour after trauma. The enzyme activity of the negative controls also increased within the first half hour after trauma, but to a much lower extend. The concentration of the CK-MM in exposed animals was highest between 30 and 120 Minutes after trauma and declined afterwards. In this time-frame (30 to 120 minutes) there were clear differences in samples of exposed and non-exposed (negative control) animals.

Conclusions concerning the myoglobin concentration after trauma could not be drawn. The marker used by the clinical chemistry department was not suitable. The performance data could not be analyzed.

According to the latest state of knowledge, this study is the first, analyzing posterior cervical muscles, facet joints and additionally serum markers to detect injuries in the course of a whiplash-like exposure, in a pig model. Up to this point there was lack of information concerning porcine cervical muscles, especially the localization of the single muscles in comparison to the human cervical muscles. This was acquired within this study. For the first time, bleedings were detected in the deep obliquus muscle, as well as in the complexus and splenius muscles which were additionally confirmed by MRI. Further studies should be conducted to see whether the injuries in the posterior cervical muscles also occur under lower exposure forces.

The analysis of the serum markers as an indicator for muscular injuries showed, that CK-MM levels increase in exposed animals in contrast to non-exposed. Therefore, the CK-MM proves to be a suitable marker for muscular injuries in the porcine model as well.

In the facet joints only minor vital reactions could be detected. Therefore a proof of vital, trauma causal injuries is not given. Nevertheless, there are no comparative histological results relating to whiplash injuries. Further histological analysis combined with radiological methods might give more information on facet joint injuries in the course of whiplash.

## Literaturverzeichnis

- ANDERSON, S. E., BOESCH, C., ZIMMERMANN, H., BUSATO, A., HODLER, J., BINGISSER, R., ULBRICH, E. J., NIDECKER, A., BUITRAGOTELLEZ, C. H., BONEL, H. M. , HEINI, P., SCHAEAREN, S. & STURZENEGGER, M. (2012) Are there cervical spine findings at MR imaging that are specific to acute symptomatic whiplash injury? A prospective controlled study with four experienced blinded readers. *Radiology*, 262, 567-75.
- APRILL, C. & BOGDUK, N. (1992) The prevalence of cervical zygapophyseal joint pain. A first approximation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 17, 744-7.
- BARNSELEY, L., LORD, S. & BOGDUK, N. (1993) Comparative local anaesthetic blocks in the diagnosis of cervical zygapophysial joint pain. *Pain*, 55, 99-106.
- BARNSELEY, L., LORD, S. & BOGDUK, N. (1994) Whiplash injury. *Pain*, 58, 283-307.
- BARNSELEY, L., LORD, S. M. , WALLIS, B. J. & BOGDUK, N. (1995) The prevalence of chronic cervical zygapophysial joint pain after whiplash. *Spine (Phila Pa 1976)*, 20, 20-5; discussion 26.
- BETZ, P., NERLICH, A., WILSKE, J., TÜBEL, J., WIEST, I., PENNING, R., EISENMENGER, W., (1992) Immunohistochemical localization of fibronectin as a tool for the age determination of human skin wounds. *International Journal of Legal Medicine*, 105, 21-26.
- BETZ, P. (1999) Histologische Kriterien zur Altersschätzung menschlicher Hautwunden. *Rechtsmedizin*, 9, 163-169.
- BETZ, P., HAUSMANN, R., (2007) Praktische Wundaltersschätzung. *Rechtsmedizin*, 17, 55-66.
- BÖCKER, W., DENK, H.; HEITZ, Ph.U., MOCH, H. (2008). Pathologie, Elsevier, 1270.
- BOGDUK, N. (1981) The anatomy of occipital neuralgia. *Clin Exp Neurol*, 17, 167-84.
- BOGDUK, N. & MARSLAND, A. (1988) The cervical zygapophysial joints as a source of neck pain. *Spine (Phila Pa 1976)*, 13, 610-7.
- BORCHGREVINK, G. E., SMEVIK, O., NORDBY, A., RINCK, P. A., STILES, T. C. & LEREIM, I. (1995) MR imaging and radiography of patients with cervical hyperextension-flexion injuries after car accidents. *Acta Radiol*, 36, 425-8.

- BOVIM, G., BONAMICO, L., FREDRIKSEN, T. A., LINDBOE, C. F., STOLT-NIELSEN, A. & SJAASTAD, O. (1991) Topographic variations in the peripheral course of the greater occipital nerve. Autopsy study with clinical correlations. *Spine (Phila Pa 1976)*, 16, 475-8.
- BOZKUS, H., CRAWFORD, N. R., CHAMBERLAIN, R. H., VALENZUELA, T. D., ESPINOZA, A., YUKSEL, Z. & DICKMAN, C. A. (2005) Comparative anatomy of the porcine and human thoracic spines with reference to thoracoscopic surgical techniques. *Surg Endosc*, 19, 1652-65.
- CAVANAUGH, J. M., OZAKTAY, A. C., YAMASHITA, H. T. & KING, A. I. (1996) Lumbar facet pain: biomechanics, neuroanatomy and neurophysiology. *J Biomech*, 29, 1117-29.
- CAVANAUGH, J. M., LU, Y., CHEN, C. and KALLAKURI, S. (2006). "Pain generation in lumbar and cervical facet joints." *J Bone Joint Surg Am* **88 Suppl 2**: 63-67.
- CHEN, C., LU, Y., CAVANAUGH, J. M., KALLAKURI, S. and PATWARDHAN, A. (2005). "Recording of neural activity from goat cervical facet joint capsule using custom-designed miniature electrodes." *Spine (Phila Pa 1976)* **30**(12): 1367-1372.
- CURATOLO, M. (2009) Beschleunigungsverletzung der Halswirbelsäule - HWS-Schleudertrauma IN GRAF, M. G., C.; WEDIG, H.-D. (Ed.). Steinkopff Verlag.
- CURATOLO, M. , BOGDUK, N., IVANCIC, P. C., MCLEAN, S. A., SIEGMUND, G. P. & WINKELSTEIN, B. A. (2011) The role of tissue damage in whiplash-associated disorders: discussion paper 1. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36, S309-15.
- CUSICK, J. F., PINTAR, F. A. & YOGANANDAN, N. (2001) Whiplash syndrome: kinematic factors influencing pain patterns. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26, 1252-8.
- DAVIDSSON, J, FLOGÅRD, A., LÖVSUND, P., SVENSSON, M Y. (1999) BioRID P3 – Design and Performance Compared to Hybrid III and Volunteers in Rear Impacts at  $\Delta V=7$  km/h (99SC16), Proc. 43<sup>rd</sup> Stapp Car Crash Conference, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, pp. 253–265
- DATH, R., EBINESAN, A. D., PORTER, K. M. & MILES, A. W. (2007) Anatomical measurements of porcine lumbar vertebrae. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 22, 607-13.
- DEHNER, C., ELBEL, M., SCHICK, S., WALZ, F., HELL, W. & KRAMER, M. (2007) Risk of injury of the cervical spine in sled tests in female volunteers. *Clin Biomech; (Bristol, Avon)* 22(6): 615-622.

- DICKEY, J. D., GA.; BEDNAR, DA (2003) Comparison of porcine and human lumbar flexion mechanics. *Vet Comp Orthop Traumatol* 16, 44-49.
- DONG, L., QUINDLEN, C., LIPSCHUTZ, D. E. and WINKELSTEIN, B.A. (2012). "Whiplash-like facet joint loading initiates glutamatergic responses in the DRG and spinal cord associated with behavioral hypersensitivity." *Brain Res* **1461**: 51-63.
- DRAKE, J. A., CD.; MCGILL, SM.; CALLAGHAN, JP. (2005) The influence of static axial torque in combined loading on intervertebral joint failure mechanics using a porcine model. *Clin Biomech*, 20, 1038-45.
- DUCIC, I., MORIARTY, M. & AL-ATTAR, A. (2009) Anatomical variations of the occipital nerves: implications for the treatment of chronic headaches. *Plast Reconstr Surg*, 123, 859-63; discussion 864.
- ELLIOTT, J., JULL, G., NOTEBOOM, J. T., DARNELL, R., GALLOWAY, G. & GIBBON, W. W. (2006) Fatty infiltration in the cervical extensor muscles in persistent whiplash-associated disorders: a magnetic resonance imaging analysis. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31, E847-55.
- GILES, L. G. & HARVEY, A. R. (1987) Immunohistochemical demonstration of nociceptors in the capsule and synovial folds of human zygapophyseal joints. *Br J Rheumatol*, 26, 362-4.
- GRAUER, J. N., PANJABI, M. M. , CHOLEWICKI, J., NIBU, K. & DVORAK, J. (1997) Whiplash produces an S-shaped curvature of the neck with hyperextension at lower levels. *Spine (Phila Pa 1976)*, 22, 2489-94.
- GRAVEN-NIELSEN, T. C., M.; MENSE, S. (2006) Central sensitization referred pain, and deep tissue hyperalgesia in musculoskeletal pain. *11th World Congress of pain*. Seattle, WA: IASP Press
- GREHER, M., MORIGGL, B., CURATOLO, M. , KIRCHMAIR, L. & EICHENBERGER, U. (2010) Sonographic visualization and ultrasound-guided blockade of the greater occipital nerve: a comparison of two selective techniques confirmed by anatomical dissection. *Br J Anaesth*, 104, 637-42.
- GRAF, N., GÜRKOV, R. (2010) *Klinische Chemie* Elsevier. Diagnostik nach Organsystemen, 44 ff.
- HALDEMAN, S.; CARROLL, L.; CASSIDY, J.D.; SCHUBERT, J.; NYGREN, Å. (2008). " The Bone and Joint Decade 2000-2010 Task Force on Neck Pain and Its associated disorders." *Eur Spine J*, 17(1): 5-7.
- HAUSER, R.; FECHNER, G.; BRINKMANN, B. (1990). Zur Unterscheidung zwischen intravitalen und postmortalen Blutungen. *Beitr Gerichtl Med*, 48. Jg., S. 437-441.
- HELL, W., (2000). Neck Circumference and its relationship to injury, Institute for Vehicle Safety, Munich.

- HELLIWELL, P.S., EVANS, P.F. and WRIGHT, V. (1994) The straight cervical spine: does it indicate muscle spasm? *J Bone Joint Surg Br*, 76(1): 103-106.
- INAMI, S., SHIGA, T., TSUJINO, A., YABUKI, T., OKADO, N. & OCHIAI, N. (2001) Immunohistochemical demonstration of nerve fibers in the synovial fold of the human cervical facet joint. *J Orthop Res*, 19, 593-6.
- IVANCIC, P. C., PEARSON, A. M., PANJABI, M. M. and ITO, S. (2004). "Injury of the anterior longitudinal ligament during whiplash simulation." *Eur Spine J* 13(1): 61-68.
- JANSEN, G. B., EDLUND, C., GRANE, P., HILDINGSSON, C., KARLBERG, M., LINK, H., MAWE, U., PORTALA, K., RYDEVIK, B. and STERNER, Y. (2008). "Whiplash injuries: diagnosis and early management. The Swedish Society of Medicine and the Whiplash Commission Medical Task Force." *Eur Spine J* **17 Suppl 3**: S355-417.
- JOHANSSON, B. H. (2006) Whiplash injuries can be visible by functional magnetic resonance imaging. *Pain Res Manag*, 11, 197-9.
- JONSSON, H., Jr., BRING, G., RAUSCHNING, W. and SAHLSTEDT, B. (1991). "Hidden cervical spine injuries in traffic accident victims with skull fractures." *J Spinal Disord* **4**(3): 251-263.
- KAALE, B.R., KRAKENES, J., ALBREKTSSEN, G., WESTER, K. (2005). "Head position and impact direction in whiplash injuries: associations with MRI-verified lesions of ligaments and membranes in the upper cervical spine." *J Neurotrauma* **22** (11), 1294-302.
- KANEOKA, K., ONO, K., INAMI, S. & HAYASHI, K. (1999). "Motion analysis of cervical vertebrae during whiplash loading." *Spine (Phila Pa 1976)*, 24, 763-9; discussion 770.
- KETTLER, A. L., L.; HAEGELE, B.; WILKE, HJ. (2007). "Are the spines of calf, pig and sheep suitable models for pre-clinical implant tests?" *Eur Spine J*, 16, 2186-92.
- KIXMÖLLER, M. (2004) „Labordiagnostische Referenzbereiche bei unterschiedlichen Schweinerassen sowie histopathologische und immunhistochemische Untersuchung von Gehirnen älterer Sauen und Eber auf transmissible spongiforme Enzephalopathie im Rahmen der TSE-Studie“, *Klinik für Schweine, Tierärztliche Fakultät Ludwig-Maximilians-Universität München*, Dissertation.
- KONGSTED, A., SORENSEN, J. S., ANDERSEN, H., KESELER, B., JENSEN, T. S. & BENDIX, T. (2008). "Are early MRI findings correlated with long-lasting symptoms following whiplash injury? A prospective trial with 1-year follow-up." *Eur Spine J*, 17, 996-1005.
- KONIKOFF, F., HALEVY, J. & THEODOR, E. (1985) "Serum creatine kinase after intramuscular injections." *Postgrad Med J*, 61, 595-8.



- KRAFFT, M. K., A.; YDENIUS, A.; TINGVALL, C. (2002). "Influence of Crash Pulse Characteristics on Whiplash Associated Disorders in Rear Impacts--Crash Recording in Real Life Crashes. " *Traffic Inj Prev*, 3, 141-49.
- KRAKENES, J., KAALE, B. R., MOEN, G., NORDLI, H., GILHUS, N. E. & RORVIK, J. (2003). "MRI of the tectorial and posterior atlanto-occipital membranes in the late stage of whiplash injury." *Neuroradiology*, 45, 585-91.
- KUMAR, S., FERRARI, R. & NARAYAN, Y. (2004). Cervical muscle response to whiplash-type right anterolateral impacts. *Eur Spine J*, 13, 398-407.
- LEE, K. E., THINNES, J. H., GOKHIN D. S. & WINKELSTEIN, B. A. (2004). "A novel rodent neck pain model of facet-mediated behavioral hypersensitivity: implications for persistent pain and whiplash injury." *J Neurosci Methods* **137**(2): 151-159.
- LEMMEN, P., BURRA, N., KANT, R., LAKSHMINARAYANA, A., GUPTA, A., CHANG, F., ZHOU, H., CARLSSON, A. (2012) ADSEAT, CP Sustainable Surface Transport, Deliverable 3 Report on EvaRid model and its validation.
- LENGERKEN, G. V. P., H. (1977) Einfluß von Transport und Schlachtung auf die Variabilität biochemischer Kennwerte im Blutplasma *Mh. Vet. Med. Jena*, 32, 620-624.
- LORD, S. M., BARNESLEY, L., WALLIS, B. J. & BOGDUK, N. (1996) Chronic cervical zygapophysial joint pain after whiplash. A placebo-controlled prevalence study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 21, 1737-44; discussion 1744-5.
- LU, Y., CHEN, C., KALLAKURI, S., PATWARDHAN, A. And CAVANAUGH, J. M. (2005). "Neural response of cervical facet joint capsule to stretch: a study of whiplash pain mechanism. " *Stapp Car Crash J* **49**: 49-65.
- LU, Y., CHEN, C., KALLAKURI, S., PATWARDHAN, A. And CAVANAUGH, J. M. (2005). "Neurophysiological and biomechanical characterization of goat cervical facet joint capsules." *J Orthop Res* **23**(4): 779-787.
- MACNAB, I. (1969) Acceleration - extension injuries of the cervical spine. *AAOS Symposium of the Spine* St. Louis, MO, USA.
- MAGNUSSON, T., RAGNARSSON, T. & BJORNSSON, A. (1996) Occipital nerve release in patients with whiplash trauma and occipital neuralgia. *Headache*, 36, 32-6.
- MCCONNELL, W. H. & GUZMAN, H. (1993). "Analysis of human test subject kinematic responses to low velocity rear end impact." *SAE 930889 SP-975*: 21-30.

- MCLAIN, R. F. (1994) Mechanoreceptor endings in human cervical facet joints. *Spine (Phila Pa 1976)*, 19, 495-501.
- MCPARTLAND, J. M. B. R. R. (1999) Rectus capitis posterior minor: a small but important suboccipital muscle. *Journal of Bodywork and Movement Therapies* 3, 30-35.
- MEIBOM, N. v. (2006). Stellenwert der Magnetresonanztomographie und des visuellen analogen Schmerzscore in der Akut-Diagnostik der Beschleunigungsverletzung – eine prospektive Studie an 63 Patienten. Dr. med., Universitätsmedizin Berlin
- MERTZ, H. P., LM. (1967) Investigation of the Kinematics and Kinetics of Whiplash. *11th STAPP Car Crash Conf.* Anaheim, California, USA, SAE, Inc. New York
- MULISCH, M. , WELSCH, U. (2010) Romeis IN SPEKTRUM (Ed.) *Mikroskopische Technik*
- MUSER, M. W., WALZ, F., SCHMITT, K.-U. (2001). Injury Criteria Applied to Seat Comparison Tests. IIWPG/IRCOBI\_Isle of Man, UK.
- MYRAN, R., KVISTAD, K. A., NYGAARD, O. P., ANDRESEN, H., FOLVIK, M. & ZWART, J. A. (2008) Magnetic resonance imaging assessment of the alar ligaments in whiplash injuries: a case-control study. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33, 2012-6.
- NEWTON, P. F., CL.; UPASANI, VV.; CHAMBERS, RC.; VARLEY, E.; TSUTSUI, S. (2010) Effect of intraoperative tensioning of an anterolateral spinal tether on spinal growth modulating in a porcine model *Spine (Phila Pa 1976)*, 36, 106-17.
- NORDIN, M., FRANKEL, V.H. (2001). Basic Biomechanics of the Musculo-skeletal System.
- OHTORI, S., TAKAHASHI, K., CHIBA, T., YAMAGATA, M. , SAMEDA, H. & MORIYA, H. (2001) Sensory innervation of the cervical facet joints in rats. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26, 147-50.
- ONI, O. O., FENTON, A., IQBAL, S. J. & GREGG, P. J. (1989) Prognostic indicators in tibial shaft fractures: serum creatinine kinase activity. *J Orthop Trauma*, 3, 345-7.
- ONO, K., KANEOKA, K., K.; WITTEK, A.; KAJZER, J. (1997) Cervical injury mechanism based on the analysis of human cervical vertebral motion and head-neck-torso kinematics during low speed rear impacts. *Proceedings of the 41st Stapp Car Crash Conference* Lake Buena Vista, Florida

- ORTENGREN, T., HANSSON, H. A., LOVSUND, P., SVENSSON, M. Y., SUNESON, A. & SALJO, A. (1996) Membrane leakage in spinal ganglion nerve cells induced by experimental whiplash extension motion: a study in pigs. *J Neurotrauma*, 13, 171-80.
- PANJABI, M. M., CHOLEWICKI, J., NIBU, K., GRAUER, J. & VAHLIDIEK, M. (1998a) Capsular ligament stretches during in vitro whiplash simulations. *J Spinal Disord*, 11, 227-32.
- PANJABI, M. M., CHOLEWICKI, J., NIBU, K., GRAUER, J. N., BABAT, L. B. & DVORAK, J. (1998b) Mechanism of whiplash injury. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 13, 239-249.
- PANJABI, M. M., ITO, S., PEARSON, A. M. and IVANCIC, P. C. (2004). "Injury mechanisms of the cervical intervertebral disc during simulated whiplash." *Spine (Phila Pa 1976)* **29**(11): 1217-1225.
- PANJABI, M. M. (2006). A hypothesis of chronic back pain: ligament subfailure injuries lead to muscle control dysfunction. *Eur Spine J*, 15, 668-76.
- PEARSON, A. M., IVANCIC, P. C., ITO, S. & PANJABI, M. M. (2004). Facet joint kinematics and injury mechanisms during simulated whiplash. *Spine (Phila Pa 1976)*.
- PENNING, L. (1995). Kinematics of cervical spine injury. *European Spine Journal*, 4(2), 126-132
- PENNING, R. (2006). Rechtsmedizin systematisch UNI-MED. **2**.
- PETTERSSON, K., HILDINGSSON, C., TOOLANEN, G., FAGERLUND, M. and BJORNEBRINK, J. (1997). "Disc pathology after whiplash injury. A prospective magnetic resonance imaging and clinical investigation." *Spine (Phila Pa 1976)* **22**(3): 283-287; discussion 288.
- PLONAIT, H. B., K., (2004) Lehrbuch der Schweinekrankheiten, Parey Verlag.
- QUINN, K. P., LEE, K. E., AHAGHOTU, C. C. and WINKELSTEIN B. A. Winkelstein (2007). "Structural changes in the cervical facet capsular ligament: potential contributions to pain following subfailure loading." *Stapp Car Crash J* **51**: 169-187.
- REDDY, M., REDDY, B., SCHOGGL, A., SARINGER, SARINGER, W. and MATULA, C. (2002). "The complexity of trauma to the cranio-cervical junction: correlation of clinical presentation with Doppler flow velocities in the V3-segment of the vertebral arteries." *Acta Neurochir (Wien)* **144**(6): 575-580; discussion 580.
- RONNEN, H. R., DE KORTE, P. J., BRINK, P. R., VAN DER BIJL, H. J., TONINO, A. J. & FRANKE, C. L. (1996) Acute whiplash injury: is there a role for MR imaging?--a prospective study of 100 patients. *Radiology*, 201, 93-6.

- SCALI, F., MARSILI, E. S. & PONTELL, M. E. (2011) Anatomical connection between the rectus capitis posterior major and the dura mater. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36, E1612-4.
- SCHICK S., TOMASCH E., SCHMITT K.-U. (2013) "Estimation of the Socio-economic benefit", Deliverable D 1.2, Workpackage 1 "Real World Data", EU-Project ADSEAT - Adaptive Seat to Reduce Neck Injuries in Male and Female Occupants, Project No. 233904, 7<sup>th</sup> FRP, 2013
- SCHMIDT, R., RICHTER, M. , CLAES, L., PUHL, W. & WILKE, H. J. (2005) Limitations of the cervical porcine spine in evaluating spinal implants in comparison with human cervical spinal segments: a biomechanical in vitro comparison of porcine and human cervical spine specimens with different instrumentation techniques. *Spine (Phila Pa 1976)*, 30, 1275-82.
- SCHWERD, W. (1992). Rechtsmedizin - Lehrbuch für Mediziner und Juristen **5**: 49.
- SCOTT, S. & SANDERSON, P. L. (2002) Whiplash: a biochemical study of muscle injury. *Eur Spine J*, 11, 389-92.
- SERIC, V., BLAZIC-COP, N. and DEMARIN, V. (2000). "Haemodynamic changes in patients with whiplash injury measured by transcranial Doppler sonography (TCD)." *Coll Antropol* **24**(1): 197-204.
- SIEGMUND, G. P., MYERS, B. S., DAVIS, M. B., BOHNET, H. F. & WINKELSTEIN, B. A. (2001) Mechanical evidence of cervical facet capsule injury during whiplash: a cadaveric study using combined shear, compression, and extension loading. *Spine (Phila Pa 1976)*, 26, 2095-101.
- SIEGMUND, G. P., WINKELSTEIN, B. A., IVANCIC, P. C., SVENSSON, M. Y. & VASAVADA, A. (2009) The anatomy and biomechanics of acute and chronic whiplash injury. *Traffic Inj Prev*, 10, 101-12.
- SMITH, C. (2000) Information Resources on Swine in Biomedical Research 1990-2000. AWIC Resource Series No. 11, United States Department of Agriculture.
- SPITZER, W. S., SKOVRON, ML.; SALMI, LR.; CASSIDY, JD.; DURAANCESU, J.; SUISSA, S.; ZEISS, E. (1995). "Scientific monograph of the Quebec task Force " *Spine (Phila Pa 1976)* **20**: 2-73.
- STEMPER, B. D., YOGANANDAN, N., GENNARELLI, T. A. and PINTAR F. A. (2005). "Localized cervical facet joint kinematics under physiological and whiplash loading." *J Neurosurg Spine* **3**(6): 471-476.
- SVENSSON, M. Y. (1993) Neck injuries in rear-end car collisions. Chalmers University of Technology; Göteborg.

- SVENSSON, M. Y., ALDMAN, B., BOSTROM, O., DAVIDSSON, J., HANSSON, H. A., LOVSUND, P., SUNESON, A. and SALJO, A. (1998). "Nerve cell damages in whiplash injuries. Animal experimental studies." *Orthopäde* **27**(12): 820-826.
- SVENSSON, M. Y., BOSTRÖM, O., DAVIDSSON, J., HANSSON, H. A., HÅLAND, Y., LÖVSUND, P., SUNESON, A. & SÄLJÖ, A. (2000). Neck injuries in car collisions—a review covering a possible injury mechanism and the development of a new rear-impact dummy. *Accident Analysis & Prevention*, 32(2), 167-175.
- SWAIN, D. G., NIGHTINGALE, P. G., GAMA, R. & BUCKLEY, B. M. (1990) Cardiac enzyme changes in elderly fallers. *Age Ageing*, 19, 207-11.
- TAYLOR, J. R., TWOMEY, L. T. and KAKULAS, B. A. (1998). "Dorsal root ganglion injuries in 109 blunt trauma fatalities." *Injury* **29**(5): 335-339.
- THUNBERG, J., HELLSTROM, F., SJOLANDER, P., BERGENHEIM, M. , WENNGREN, B. and JOHANSSON, H. (2001). "Influences on the fusimotor-muscle spindle system from chemosensitive nerve endings in cervical facet joints in the cat: possible implications for whiplash induced disorders." *Pain* **91**(1-2): 15-22.
- TORTORA, G. J., GRABOWSKI, S. (2003). *Principles of Anatomy&Physiology*, John Wiley & Sons. Inc. 10: 1104.
- UHLIG, Y., WEBER, B. R., GROB, D. & MUNTENER, M. (1995) Fiber composition and fiber transformations in neck muscles of patients with dysfunction of the cervical spine. *J Orthop Res*, 13, 240-9.
- VAN DEN BERG, F. (1999). *Angewandte Physiologie*. Thieme Verlag.
- VAN GEOTHEM, J. W., BILTJES, I. G., VAN DEN HAUWE, L., PARIZEL, P. M. & DE SCHEPPER, A. M. (1996) Whiplash injuries: is there a role for imaging? *Eur J Radiol*, 22, 30-7.
- VASAVADA, A. N., BRAULT, J. R. & SIEGMUND, G. P. (2007) Musculotendon and fascicle strains in anterior and posterior neck muscles during whiplash injury. *Spine (Phila Pa 1976)*, 32, 756-65.
- VITAL, J. M., GRENIER, F., DAUTHERIBES, M. , BASPEYRE, H., LAVIGNOLLE, B. & SENEGAS, J. (1989) An anatomic and dynamic study of the greater occipital nerve (n. of Arnold). Applications to the treatment of Arnold's neuralgia. *Surg Radiol Anat*, 11, 205-10.
- WIKSTRÖM, J. M. , J.; RODRIGUEZ R, JR. (1967) The cervical sprain syndrome: Experimental acceleration injuries to the head and neck IN SELZER, M. G., PW.; HUELKE, DF (Ed.) *The Prevention of Highway Injury*. Ann Harbour, Michigan Highway Safety Research Institute

- WILKE, H. J., GEPPERT, J. & KIENLE, A. (2011) Biomechanical in vitro evaluation of the complete porcine spine in comparison with data of the human spine. *Eur Spine J*, 20, 1859-68.
- WINKELSTEIN, B. A., NIGHTINGALE, R. W., RICHARDSON, W. J. & MYERS, B. S. (2000) The cervical facet capsule and its role in whiplash injury: a biomechanical investigation. *Spine (Phila Pa 1976)*, 25, 1238-46.
- YANG, K. B., MUSER, P.C., NIEDERER, M. H., NIEDERER, P., WALZ, F.H., (1997). On the Role of Cervical Facet Joints in Rear End Impact Neck Injury Mechanisms, Motor Vehicle Safety Desing Innovations (SP-1226) SAE 970497.
- YINGLING, V. R., CALLAGHAN, J. P. & MCGILL, S. M. (1999) The porcine cervical spine as a model of the human lumbar spine: an anatomical, geometric, and functional comparison. *J Spinal Disord*, 12, 415-23.
- YOGANANDAN, N. & PINTAR, F. A. (1997) Inertial loading of the human cervical spine. *J Biomech Eng*, 119, 237-40.
- YOGANANDAN, N., PINTAR, F. A. & KLIENBERGER, M. (1998) Cervical spine vertebral and facet joint kinematics under whiplash. *J Biomech Eng*, 120, 305-7.
- YOGANANDAN, N.; STEMPER, B.D.; PINTAR, F.A. and MAIMAN, D.J. (2011). "Use of postmortem human subjects to describe injury responses and tolerances." Clin Anat **24**(3): 282-293.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Matthias Graw, der mir die Möglichkeit gab meine Dissertation am Institut für Rechtsmedizin durchführen zu können.

Meinem Vorgesetzten Herrn Dr. Wolfram Hell möchte ich für die Überlassung des spannenden Themas sowie seinen stetigen Einsatz und seine Unterstützung danken.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Sylvia Schick möchte ich an dieser Stelle ein ganz großes Dankeschön aussprechen. Ich danke dir für deine aufmunternden Worte und deine Unterstützung in allen Situationen. Diese Arbeit sowie die Publikation wären ohne dich nicht möglich gewesen!

Meinen lieben Kollegen möchte ich dafür danken, dass sie mir die Arbeit am Institut zu einer unvergesslichen Zeit gemacht haben. Vielen Dank liebe(r) Sarah, Carola, Klaus, Kristin, Stefan, Philipp, Anja W., Anja F. und Feli ich werde Euch auf jeden Fall in guter Erinnerung behalten! Besonders möchte ich aber Euch, liebe Sarah und Carola danken. Ihr hattet in allen Lebenslagen immer ein offenes Ohr für mich und ich kann gar nicht aufzählen wie oft ich mit Euch Tränen gelacht habe. Danke für diese wundervolle Zeit und das ihr mir so gute Freunde geworden seid.

Herrn Prof. Dr. Benedikt Schoser vom Friedrich-Bauer-Institut sowie Herrn Prof. Karl Sotlar aus dem Pathologischen Institut der LMU München, danke ich für Ihre Unterstützung bei den histologischen Auswertungen und dafür, dass Sie sich als Prüfer meiner Promotionsvorprüfung zur Verfügung gestellt haben.

Prof. Dr. Andreas Nehrlich und Herrn Dr. Helmut Rohrbach möchte ich für die Durchführung der Fibronektinfärbung und die Nutzung des Mikroskops danken.

Meinen lieben Kollegen aus Schweden möchte ich an dieser Stelle für die wundervolle Zusammenarbeit und die tolle Zeit in Stockholm beziehungsweise Uppsala danken. Stort tack till Mats, David, Ulf och Jenny! Jag är glad att ha träffat dig och tack for det stora stöd.

Dr. Sebastian Kunz möchte ich an dieser Stelle auch nochmal einen herzlichen Dank für seine tatkräftige Unterstützung während der Versuche danken. Vielen lieben Dank auch für die lustige Zeit in Stockholm!

Herrn Dr. Peter Noel und Herrn Dr. Alexander Fingerle aus der Radiologie des Klinikums rechts der Isar, danke ich für ihre großartige Unterstützung bei der Befundung der MRT-Aufnahmen sowie die Durchführung des MRTs an den Facettengelenken.

Marian Willner und Frau Dr. Julia Herzen aus der Biophysik der TU München danke ich ganz herzlich für die nette und zuverlässige Zusammenarbeit und vor allem für die Möglichkeit die Facettengelenke im Phasen-Kontrast-Röntgen analysieren zu können.

Frau Fazekas aus dem anatomischen Institut der LMU sowie Frau Dr. Herbach aus der Tierpathologie der LMU danke ich für die großartige Hilfe bei der Erstellung der histologischen Schnitte.

Natürlich gilt mein besonderer Dank meiner lieben Familie. Ich Danke vorallem meiner lieben Mutter, dass Sie immer für mich da war und mir immer gut zuredet hat auch wenn das Ziel noch so unerreichbar schien. Durch Ihren unglaublichen Kampfgeist war Sie mir bis zuletzt immer ein großes Vorbild.

Papa, danke für deine Motivation und Unterstützung, durch deine Gelassenheit die die Dinge zu sehen, hast du mir immer wieder klar gemacht, dass man sich so schnell durch nichts aus der Ruhe bringen lassen darf und dass es irgendwie immer weitergeht. Meinem lieben Mann möchte ich danken, dass er mich vorallem in der finalen Phase so stark unterstützt hat und für mich immer die Nerven behalten hat. Vielen lieben Dank!

Zuletzt möchte ich noch meinen lieben Freunden Christl, Agnes, Andreas und Maria meinen Dank aussprechen! Bei solchen Freunden kann im Leben nichts mehr schief gehen. Ihr habt einfach immer die richtigen Worte für mich und seid da wenn ich Euch brauche.



# ANHANG

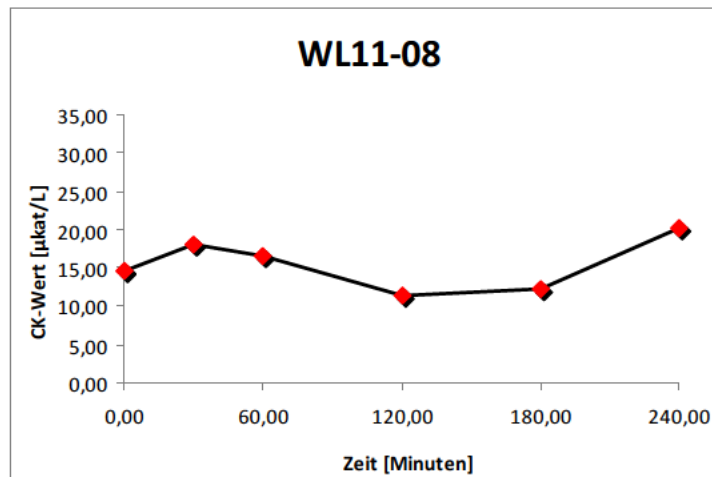
## A1 Serumanalyse

**Tabelle 14** Rohdaten der Analyse des Serummarkers Kreatinkinase Muskeltyp in der Einheit  $\mu\text{kat/L}$  und U/L pro Schwein zu jeweils sieben verschiedenen Entnahmezeitpunkten

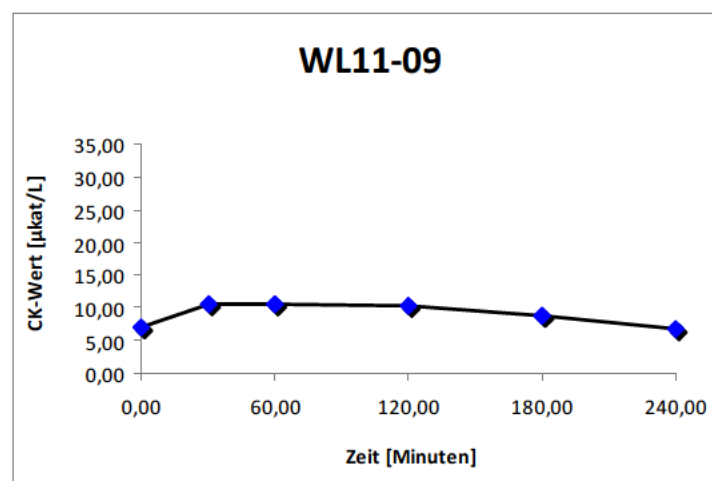
Schweine-ID (München)	Schweine-ID Labor (Schweden)	Zeitpunkt Blutentnahme [Minuten]	Serummarker	Ergebnis [ $\mu\text{kat/L}$ ]	Ergebnis [U/L]
8	WL11-08	Ausgangswert 1	CK-MM	10,26	615,6
8	WL11-08	Ausgangswert 2	CK-MM	18,78	1126,8
8	WL11-08	30	CK-MM	18,11	1086,6
8	WL11-08	60	CK-MM	16,6	996
8	WL11-08	120	CK-MM	11,43	685,8
8	WL11-08	180	CK-MM	12,3	738
8	WL11-08	240	CK-MM	20,12	1207,2
9	WL11-09	Ausgangswert 1	CK-MM	5,95	357
9	WL11-09	Ausgangswert 2	CK-MM	8,1	486
9	WL11-09	30	CK-MM	10,56	633,6
9	WL11-09	60	CK-MM	10,68	640,8
9	WL11-09	120	CK-MM	10,38	622,8
9	WL11-09	180	CK-MM	8,78	526,8
9	WL11-09	240	CK-MM	6,83	409,8
10	W11-10	Ausgangswert 1	CK-MM	5,69	341,4
10	W11-10	Ausgangswert 2	CK-MM	8,52	511,2
10	W11-10	30	CK-MM	10,71	642,6
10	W11-10	60	CK-MM	11,28	676,8
10	W11-10	120	CK-MM	10,73	643,8
10	W11-10	180	CK-MM	10,63	637,8
10	W11-10	240	CK-MM	9,81	588,6
11	WL11-11	Ausgangswert 1	CK-MM	7,52	451,2
11	WL11-11	Ausgangswert 2	CK-MM	10,44	626,4
11	WL11-11	30	CK-MM	11,92	715,2
11	WL11-11	60	CK-MM	12,27	736,2
11	WL11-11	120	CK-MM	11,47	688,2
11	WL11-11	180	CK-MM	10,8	648
11	WL11-11	240	CK-MM	9,99	599,4
12	WL11-12	Ausgangswert 1	CK-MM	13,63	817,8
12	WL11-12	Ausgangswert 2	CK-MM	14,91	894,6
12	WL11-12	30	CK-MM	15,43	925,8
12	WL11-12	60	CK-MM	15,33	919,8
12	WL11-12	120	CK-MM	15,18	910,8
12	WL11-12	180	CK-MM	13,64	818,4
12	WL11-12	240	CK-MM	10,89	653,4
n.v.	WL11-13	Ausgangswert 1	CK-MM	31,01	1860,6
n.v.	WL11-13	Ausgangswert 2	CK-MM	28,22	1693,2
n.v.	WL11-13	30	CK-MM	28,8	1728

n.v.	WL11-13	60	CK-MM	28,08	1684,8
n.v.	WL11-13	120	CK-MM	25,62	1537,2
n.v.	WL11-13	180	CK-MM	25,47	1528,2
n.v.	WL11-13	240	CK-MM	22,38	1342,8
n.v.	WL11-14	Ausgangswert 1	CK-MM	14,4	864
n.v.	WL11-14	Ausgangswert 2	CK-MM	16,23	973,8
n.v.	WL11-14	30	CK-MM	17,63	1057,8
n.v.	WL11-14	60	CK-MM	17,94	1076,4
n.v.	WL11-14	120	CK-MM	18,34	1100,4
n.v.	WL11-14	180	CK-MM	15,75	945
n.v.	WL11-14	240	CK-MM	15,16	909,6
n.v.	WL11-15	Ausgangswert 1	CK-MM	7,62	457,2
n.v.	WL11-15	Ausgangswert 2	CK-MM	9,61	576,6
n.v.	WL11-15	30	CK-MM	10,98	658,8
n.v.	WL11-15	60	CK-MM	11,41	684,6
n.v.	WL11-15	120	CK-MM	11,17	670,2
n.v.	WL11-15	180	CK-MM	11,48	688,8
n.v.	WL11-15	240	CK-MM	11,49	689,4
n.v.	WL11-16	Ausgangswert 1	CK-MM	7,85	471
n.v.	WL11-16	Ausgangswert 2	CK-MM	12,69	761,4
n.v.	WL11-16	30	CK-MM	17,65	1059
n.v.	WL11-16	60	CK-MM	19,25	1155
n.v.	WL11-16	120	CK-MM	21,26	1275,6
n.v.	WL11-16	180	CK-MM	21,87	1312,2
n.v.	WL11-16	240	CK-MM	21,23	1273,8
n.v.	WL11-17	Ausgangswert 1	CK-MM	30,59	1835,4
n.v.	WL11-17	Ausgangswert 2	CK-MM	34,48	2068,8
n.v.	WL11-17	30	CK-MM	40,31	2418,6
n.v.	WL11-17	60	CK-MM	39,69	2381,4
n.v.	WL11-17	120	CK-MM	38,87	2332,2
n.v.	WL11-17	180	CK-MM	33,62	2017,2
n.v.	WL11-17	240	CK-MM	28,75	1725

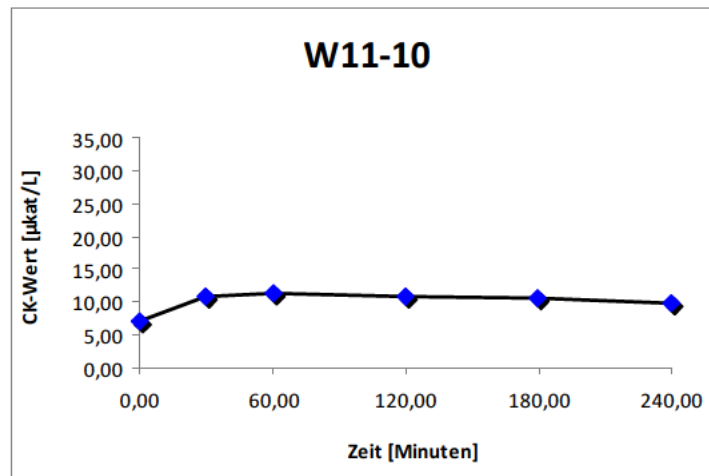
Im Folgenden werden die einzelnen CK-Aktivitäten der einzelnen Schweine graphisch dargestellt. Zeitpunkt 0 entspricht hierbei dem Mean Ausgangswert. Die Grafiken in rot entsprechen den Negativkontrollen, die blauen den exponierten Tieren.



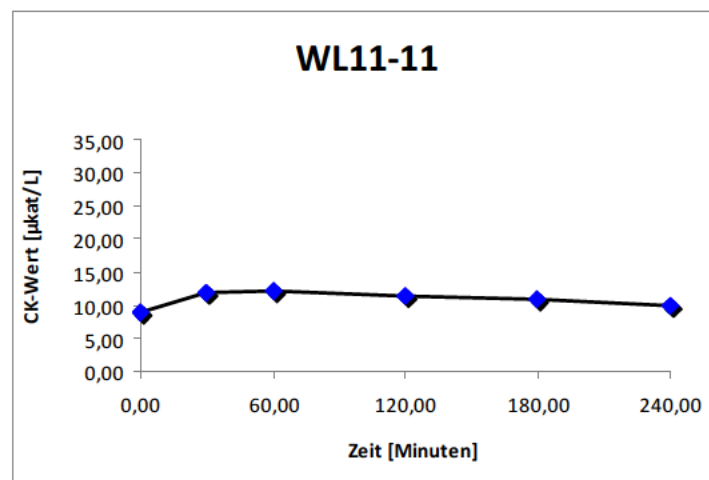
**Abbildung 36** Schwein # 8: Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden



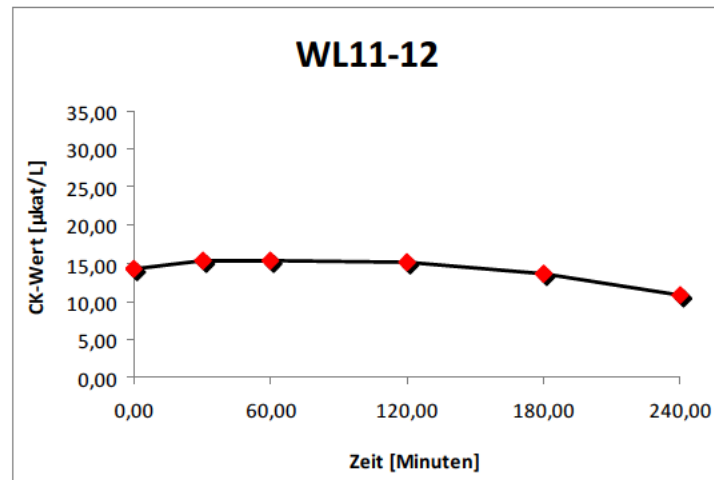
**Abbildung 37** Schwein # 9: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



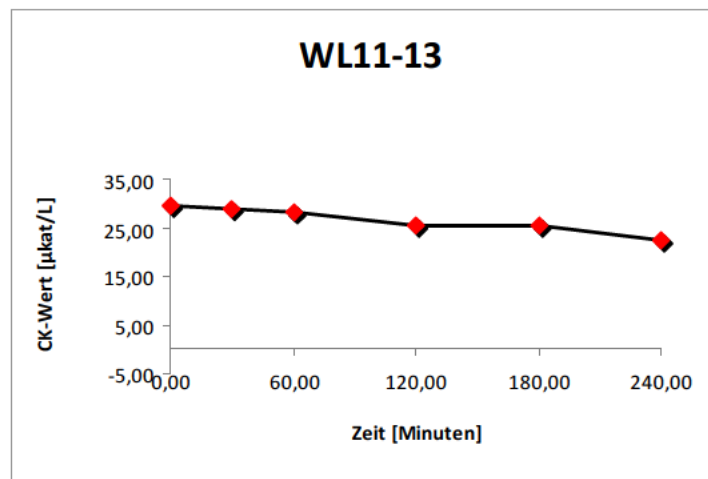
**Abbildung 38** Schwein # 10: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



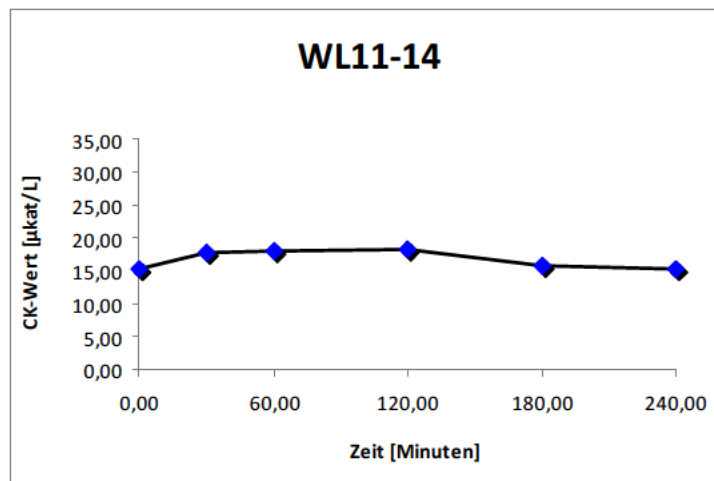
**Abbildung 39** Schwein # 11: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



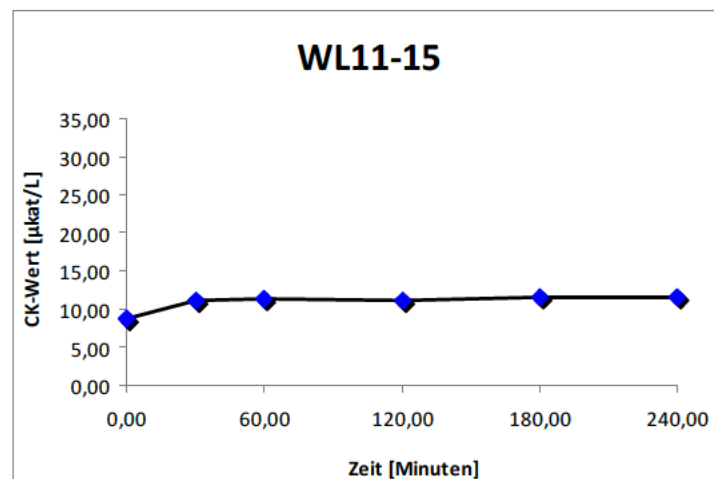
**Abbildung 40** Schwein # 12: Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden



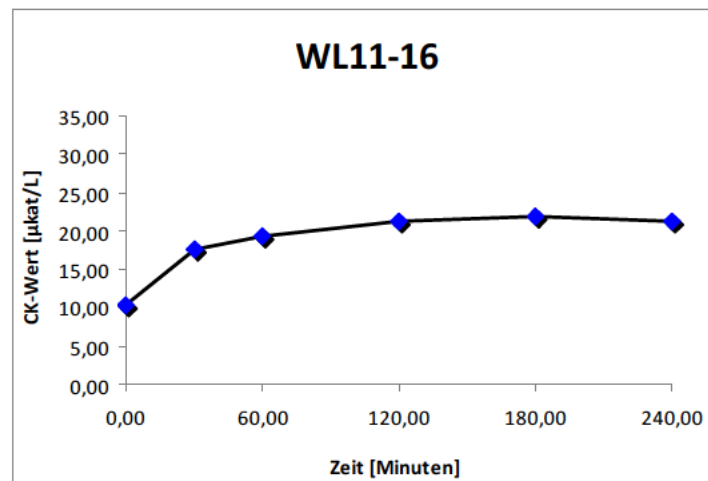
**Abbildung 41** Schwein # 13 (entspricht nicht #13 aus Tabelle in Material & Methoden, sondern schwedischer Nummerierung siehe Tabelle 14): Negativkontrolle mit einer Überlebenszeit von vier Stunden



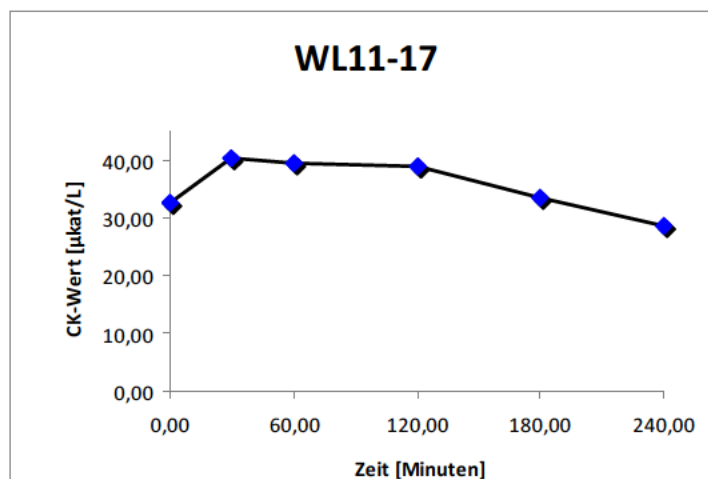
**Abbildung 42** Schwein # 14: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



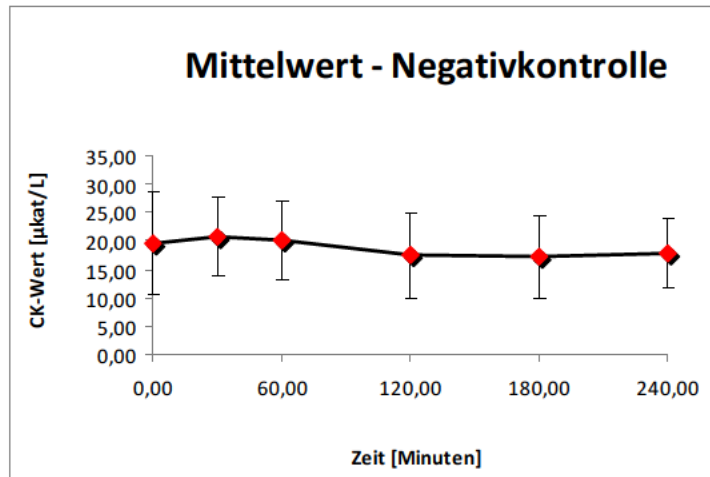
**Abbildung 43** Schwein # 15: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



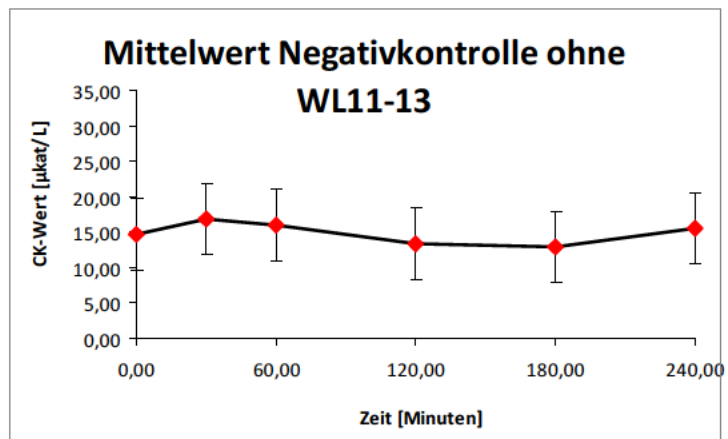
**Abbildung 44** Schwein # 16: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden



**Abbildung 45** Schwein # 17: einmalig exponiert mit 800 N und einer Überlebenszeit von vier Stunden

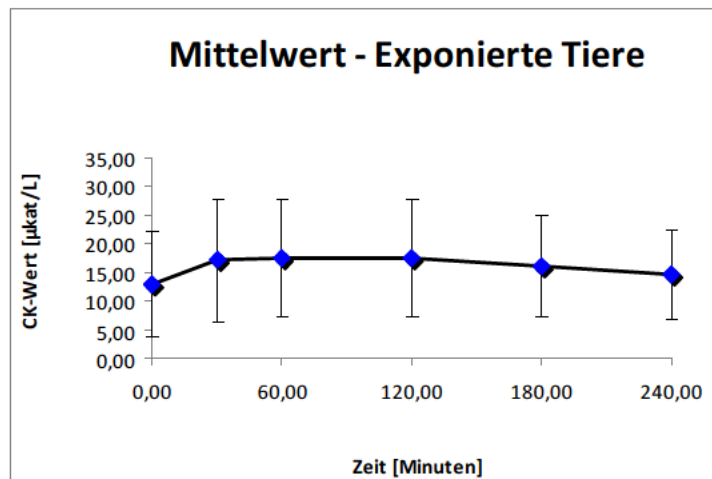


**Abbildung 46** Mittelwerte der drei Negativkontrollen  
Überlebenszeit der Tiere, vier Stunden



**Abbildung 47** Mittelwerte von zwei Negativkontrollen  
ohne Ausreisserwert; Überlebenszeit der Tiere, vier Stunden





**Abbildung 48** Mittelwerte der sieben exponierten Tiere; einmalige Exposition (800N) mit einer Überlebenszeit der Tiere von vier Stunden

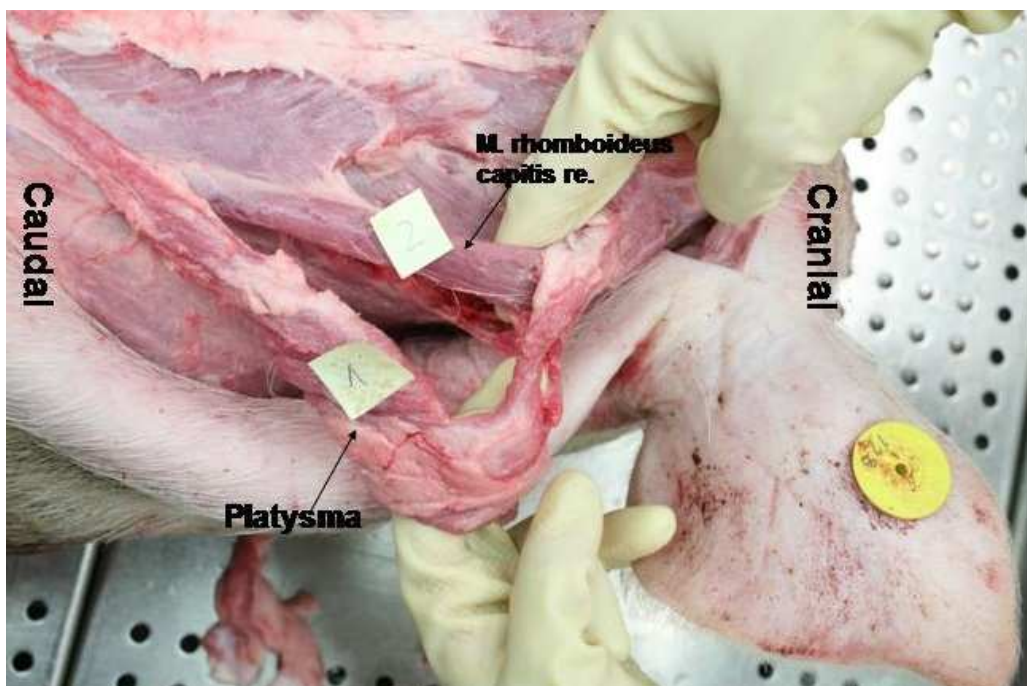
## A2 MRT-Protokoll

**Tabelle 15** Protokoll der MRT-Aufnahmen jeweils vor und nach Traumasetzung

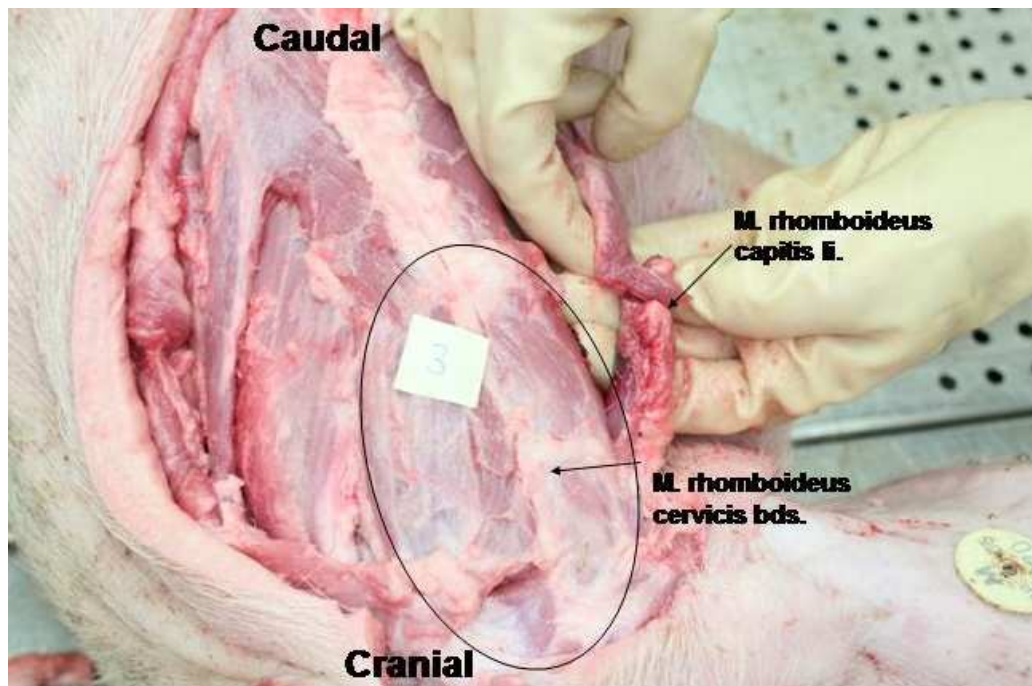
Sequenz	Dauer [Minuten]
SURVEY	00:27.8
Ref_Spine_15	00:25.5
SURVEY	00:30.3
T2 tse sag 2mm	04:00.8
T1_FLAIR sag 2mm 4nex	06:24.0
T2 STIR sag 2 mm	03:37.2
PD_SPAIR cor 2mm	06:06.3
T1 FS cor 2mm	05:24.4
PD_SPAIR tra 2mm	06:08.7
T2 STIR tra 2mm	06:47.2
THRIVE 3D 1.2mm OC	05:22.3
DWI 3mm 4b	06:52.6
Gd T2 tse 3D VISTA	04:22.0
Gd THRIVE 3D 1.2mm OC	05:22.3
Gd T1 FS cor 2mm	05:24.4
	<b>67:15.8</b>

### A3 Muskelpräparation – porzine posteriore zervikale Muskulatur

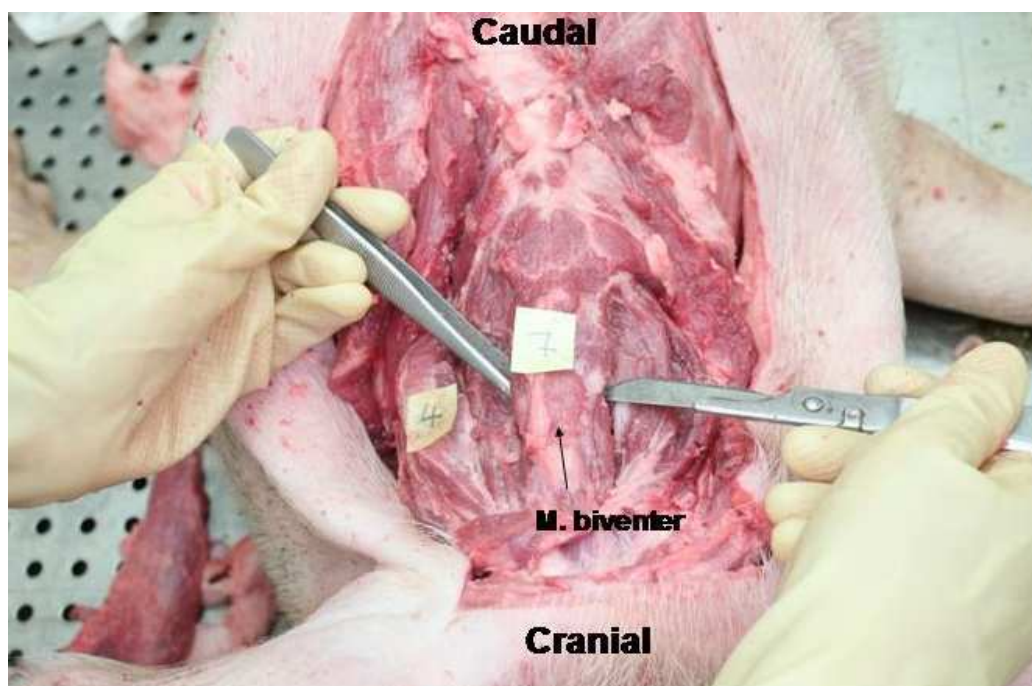
Die folgenden Abbildungen 49 - 56 zeigen die einzelnen Präparationsschritte an der porzinen posterioren zervikalen Muskulatur von den oberflächlichen zu den tiefen HWS-Muskeln eines Lehrsweines (Gewicht: 90 kg, Alter: 6 Monate) welches von der Klinik für Schweine der Tierärztlichen Fakultät in Oberschleißheim zur Verfügung gestellt wurde.



**Abbildung 49** Ansicht des M. rhomboideus rechtsseitig nach Freipräparation der Fettschicht sowie des Hautmuskels (Platysma).

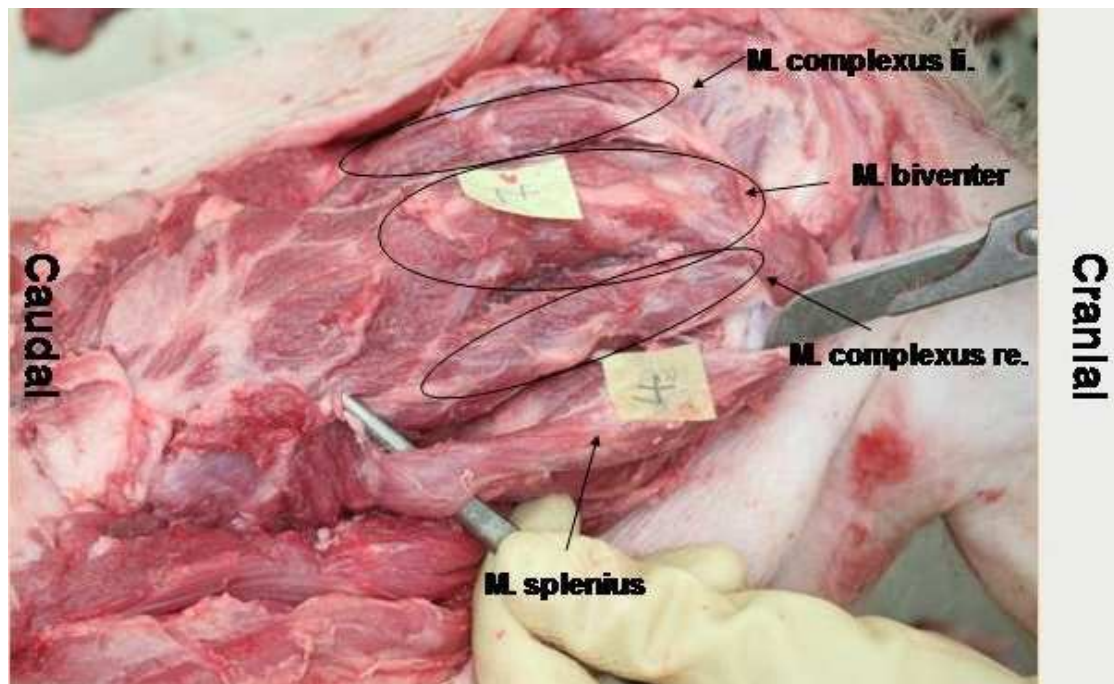


**Abbildung 50** Ansicht der Mm. rhomboidei cervicis und capitis linksseitig nach Freipräparation des Fettgewebes und der Platysma.



**Abbildung 51** Ansicht des M. biventer nach Freipräparation der Mm. rhomboidei cervicis und capitis.

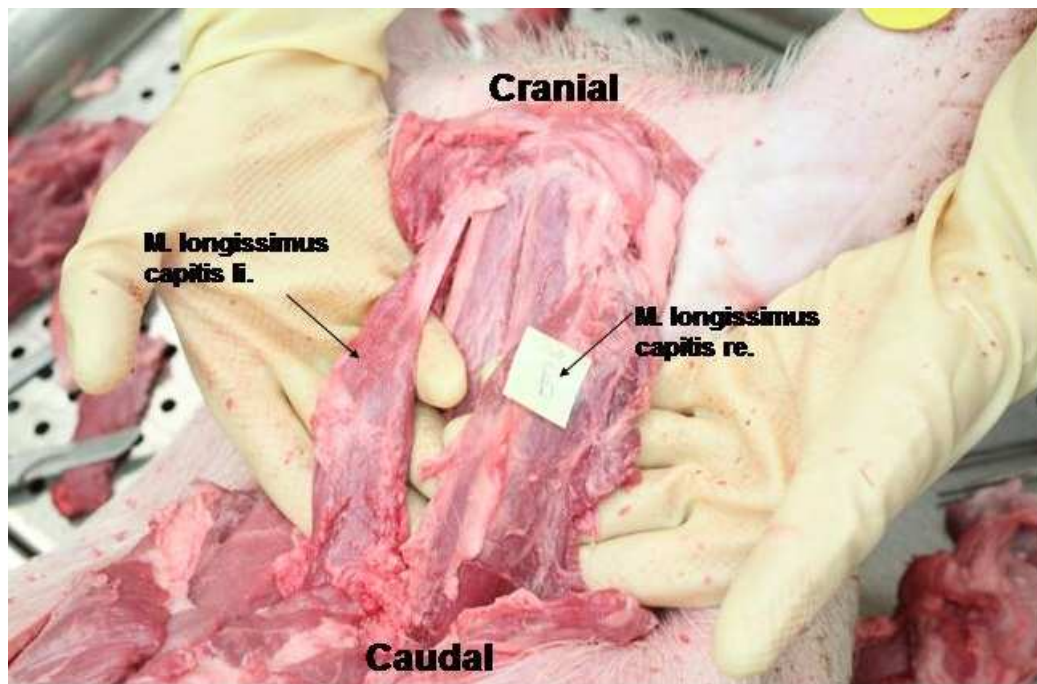




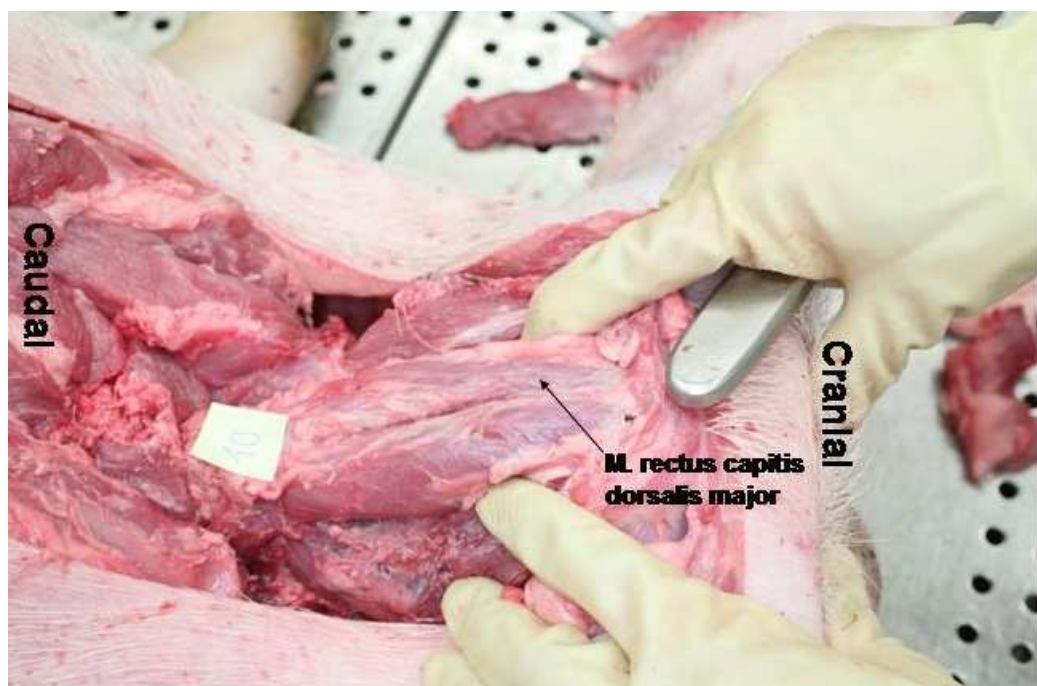
**Abbildung 52** Ansicht des M. biventer und des M. complexus rechts- und linksseitig. Der M. biventer zusammen mit dem M. complexus im Schwein, entspricht dem M. semispinalis capitis im Menschen. Nach Freipräparation des M. rhomboideus cervicis, stellt sich in der nächsten Muskelebenen der M. splenius dar welcher hier als Nummer 4 markiert ist.



**Abbildung 53** Darstellung des M. longissimus nach Freipräparation des M. biventer und M. complexus, sowie des M. splenius.

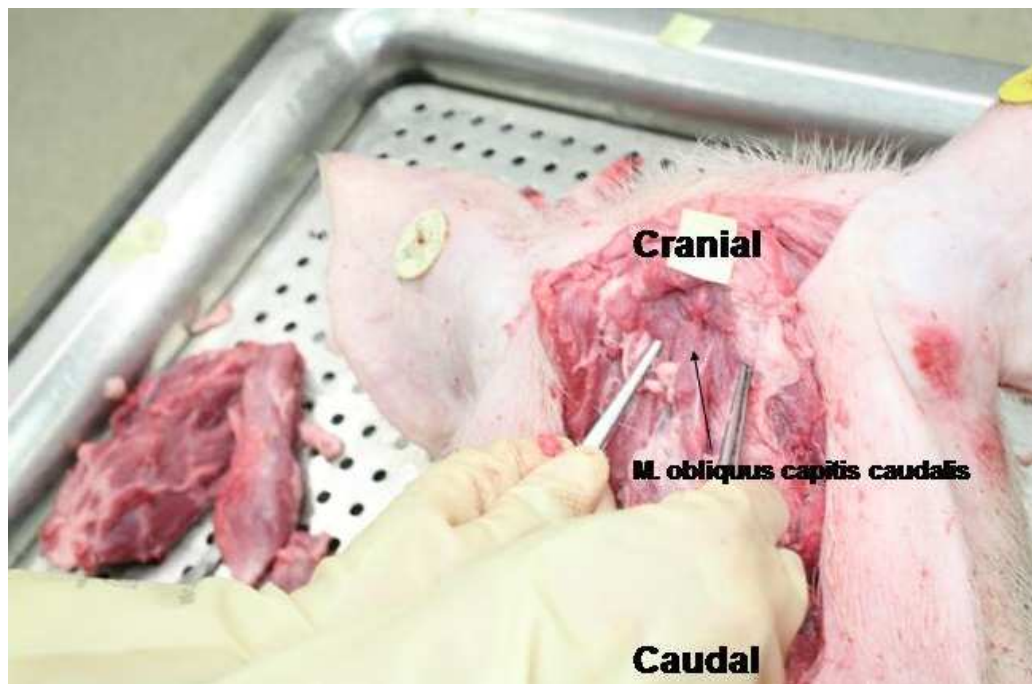


**Abbildung 54** Darstellung des M. longissimus rechts- und linksseitig.



**Abbildung 55** Darstellung des M. rectus capitis dorsalis major. Ansicht nach Freipräparation des M. longissimus.





**Abbildung 56** Ansicht des M. obliquus capitis caudalis major in der tiefsten zervikalen Muskelebene nach Freipräparation des M. rectus